

REC'D 14 JAN 2000

09/856617

PCT/JP99/06487

#3

日本国特許庁

19.11.99

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 9月 2日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第248442号

出願人

Applicant (s):

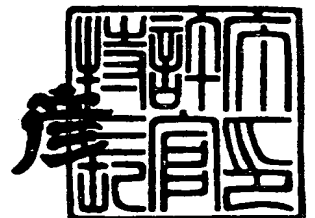
協和醗酵工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3089773

【書類名】 特許願

【整理番号】 H11-1324N2

【提出日】 平成11年 9月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会 医薬総合研究所内

【氏名】 市村 通朗

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会 医薬総合研究所内

【氏名】 廣瀬 了

【発明者】

【住所又は居所】 石川県金沢市三口新町 1 - 5 - 1

【氏名】 善岡 克次

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第332484号

【出願日】 平成10年11月24日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

特平 1 1 - 2 4 8 4 4 2

【物件名】

要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ポリペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 9 ～ 1 4 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 2】 配列番号 1 3 および 1 4 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK 3) と結合することのできるポリペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 4】 配列番号 2 ～ 7 記載の塩基配列から選ばれる塩基配列からなる DNA。

【請求項 5】 配列番号 6 または 7 記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK 3) と結合することのできるポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 6】 請求項 3 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。

【請求項 7】 組換え体 DNA が、プラスミド p cDNA 3 - S - JSAP 1 b、p cDNA 3 - S - JSAP 1 c、p cDNA 3 - S - JSAP 4 および p GAD 1 0 - JSAP 5 から選ばれる組換え体 DNA である、請求項 6 記載の組換え体 DNA。

【請求項 8】 請求項 6 または 7 記載の組換え体 DNA を保有する形質転換体。

【請求項 9】 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から選ばれる形質転換体である、請求項 8 記載の形質転換体。

【請求項 1 0】 微生物が、Escherichia 属に属する微生物である、請求項 9 記載の形質転換体。

【請求項 1 1】 Escherichia 属に属する微生物が、Escherichia coli JSAP 1b/pcDNA3 (FERM BP - 6 5 6 7)、Escherichia coli JSAP1c/pcDNA3 (

FERM BP-6568)、Escherichia coli JSAP4/pcDNA3 (FERM BP-6569) およびEscherichia coli JSAP5/pGAD10 (FERM BP-6570) から選ばれる微生物である、請求項10記載の形質転換体。

【請求項12】 請求項8～11のいずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項1または2記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、請求項1または2記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項13】 請求項3～5および配列番号5記載の塩基配列からなるDNAのいずれか1項に記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

【請求項14】 誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、請求項13記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項15】 請求項13または14記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項1または2記載のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

【請求項 16】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

【請求項 17】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを認識する抗体。

【請求項 18】 請求項 17 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

【請求項 19】 請求項 17 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの免疫組織染色法。

【請求項 20】 請求項 17 記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

【請求項 21】 配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) と結合することのできるポリペプチド、JNK3 および被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドと JNK3 との結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 22】 配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) と結合することのできるポリペプチド、活性化された JNK3 および被験試料とを接触させることを特徴とする、活性化された JNK3 による、該ポリペプチドのリン酸化を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 23】 請求項 21 または 22 に記載の方法により得られる化合物。

【請求項 24】 配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) と結合することのできるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させる

ことを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 25】 遺伝子の発現を変動を請求項 15 記載の方法を用い検出することを特徴とする、請求項 24 記載のスクリーニング方法。

【請求項 26】 ポリペプチドを請求項 18 記載の方法を用い検出することを特徴とする、請求項 24 記載のスクリーニング方法。

【請求項 27】 請求項 24～26 のいずれか 1 項に記載の方法により得られる化合物。

【請求項 28】 配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) と結合することのできるポリペプチドと JNK3 との結合阻害剤。

【請求項 29】 活性化された JNK3 による、配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) と結合することのできるポリペプチドのリン酸化阻害剤。

【請求項 30】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

【請求項 31】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

【請求項 32】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神

経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

【請求項 33】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

【請求項 34】 請求項 17 記載の抗体を含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

【請求項 35】 請求項 17 記載の抗体を含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

【請求項 36】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーター DNA。

【請求項 37】 請求項 36 記載のプロモーター DNA および該プロモーター DNA の下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項 38】 レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から選ばれる遺伝子である、請求項 37 記載のスクリーニング方法。

【請求項 39】 請求項 37 または 38 記載の方法により得られる化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、c-Jun N-terminal kinase (JNK) のアイソザイムの一つである JNK 3 に結合する新規ポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該ポリペプチドの製造方法に関する。

【0002】

また、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を産生する微生物、動物細胞又は動物、該ポリペプチドもしくはその一部又はそれらを発現した微生物もしくは動物細胞等を利用した JNK 3 シグナル伝達の阻害活性を有する化合物を探索する方法および細胞を利用した該ポリペプチドの遺伝子発現を調節する化合物を探索する方法に関する。

【0003】

【従来の技術】

細胞内情報伝達分子として重要な役割を果たしている mitogen-activated protein kinase (MAPK) によるカスケードは酵母からヒトに至るまで、真核生物に普遍的に存在する細胞内シグナル伝達経路である。

【0004】

脊椎動物では、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38、JNK/SAPK (c-Jun amino-terminal kinase/stress-activated protein kinase) の3種類のMAPK、およびそれらの活性化因子が多数同定され、機能的に異なるさまざまなMAPK経路の存在が明らかになってきた。

【0005】

tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 (IL-1)、epidermal growth factor (EGF)、endotoxic lipopolysaccharide (LPS)、heat shock、ultraviolet light (UV)、X-ray等の細胞外の種々のストレスにより、MAPKのうちJNKが活性化され、該活性化によりアポトーシス(細胞死)が誘発され则认为られている [Science, 270, 1326 (1995)]。

【0006】

即ち、ストレスにさらされた細胞において、該ストレスシグナルがsmall G-protein (Rho、Ras等) に伝わることにより、MAPK kinase kinase (MAP

KKK)の一つであるMEKK1 (MAPK kinase kinase 1) が活性化され、MAPK kinase (MAPKK) の一つであるSEK1 (もしくはMKK4とも呼ばれる。)をリン酸化し、SEK1を活性化する。該活性化されたSEK1がJNK (MAPK) をリン酸化し、JNKが活性化される。活性化されたJNKが細胞の核内の転写因子の一つであるc-Junをリン酸化し、AP-1、activating transcription factor 2 (ATF2) 等の関与の元に、リン酸化されたc-Junの転写活性が亢進され、アポトーシスが誘発されると推定されている。しかしながら、この核内のアポトーシスへの過程に関しては、ほとんど不明である。

【0007】

神経細胞であるPC12細胞を、神経細胞のタンパク性栄養因子であるnerve growth factor (NGF) 含有培地で培養し、NGFを除いてさらに培養を続けるとアポトーシスが誘発される。該アポトーシスの誘発においてJNK活性の上昇が認められることが報告されている [Science, 270, 1326(1995)]。

【0008】

3種類のJNK (JNK1、JNK2、JNK3) のうち、JNK3は脳で特に高い発現を示すことが知られている [EMBO J., 15, 2760 (1996)]。

JNK3分子のノックアウトマウスは、興奮性アミノ酸レセプターアゴニストであるカイニン酸による発作に対する耐性が確認され、野生型のマウスで見られたカイニン酸による海馬CA3領域でのアポトーシスが見られなかった [Nature, 389, 865 (1997)]。このことより、JNK3分子のノックアウトによる神経保護作用は、JNK3経路の消失によるものと考えられている。

【0009】

神経変性疾患において、アポトーシスによる神経細胞死が報告されている。即ち、アルツハイマー病患者の脳の海馬において、有意にアポトーシスを起こして死滅した神経細胞が多く見られる [Experimental Neurology, 133, 225 (1995)]、アルツハイマー病患者の脳において、DNAの断片化や、アポトーシス特有の核の変化が観察されている [Neuroreport, 5, 2529(1994)、Neuroreport, 6, 1053 (1995)]、パーキンソン病において、黒質神経細胞のアポトーシスが観察

されている [J. Neurol. Sci., 137, 120(1996)] 等の報告がある。

【0010】

JNK3が脳において高い発現を示すのに対し、JNK1およびJNK2に関しては、ほとんどの組織で発現している。JNK1およびJNK2のリン酸化基質としては、c-Junタンパク質、ATF2、Elk-1（遺伝子発現を制御する転写因子の一つ）が考えられている [Nature, 389, 865 (1997)]。

【0011】

JNK3は上記リン酸化基質に結合はするが、JNK1、JNK2に比較すると、結合は弱い [EMBO J., 15, 2760 (1996)] ため、これらが真の哺乳動物におけるリン酸化基質であるかどうかについては不明である。

JNK3のリン酸化酵素活性はc-Junタンパク質を基質として用いて見ることしかできず、JNK3と相互作用すると考えられる、哺乳動物における結合タンパク質についても一部を除いてもほとんど報告がなかったため、JNK3と相互作用し、JNK3の機能を調節しているタンパク質を用いた生化学反応を調べることはほとんどできない。

【0012】

JNK3を結合するという、上記リン酸化基質以外のポリペプチドについて、最近JNK/SAPK-associated protein (JSAP1a) が報告された [1997年日本分子生物学会(12月)]。

JSAP1aは、後述するようにJNK3経路のスキヤフォールド (scaffold) タンパク質として機能していることが推定されている。スキヤフォールドタンパク質としては、JNK1およびJNK2を結合する、JIP-1 (JNK interacting protein-1) が知られている [Science, 281, 1671 (1998)]。また、JIP-1の557番目のアミノ酸残基の後に47アミノ酸が挿入された配列を有するバリエーションJIP-1bも知られている。JIP-1およびJIP-1bをコードするcDNA配列はGenBank data baseに登録されている (accession numberはそれぞれAF003115、AF054611)。

【0013】

更に、酵母Saccharomyces cerevisiaeの接合フェロモンのシグナル伝達経路に

において、STE5タンパク質がスキャフォールドタンパク質として機能していることが知られている。

即ち、STE5タンパク質は、フェロモンがそのレセプターに結合したシグナルを伝達する一連のMAP-kinase経路にある、STE11 (MAPKKK)、STE7 (MAPKK) およびFUS/KSS1 (MAPK) のすべてのkinaseを結合し、そのシグナルを効率よく伝達する機能を有するスキャフォールドタンパク質である [Genes Dev, 8, 313 (1994)、Cell, 78, 499 (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 7762 (1994)]。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ストレスやアポトーシスを誘導するシグナルに応答して活性化されるJNK3カスケード上のJNK3に結合する新規ポリペプチド、該新規ポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドを認識する抗体などを利用し、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬、治療薬を提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

細胞のアポトーシスを起こすメカニズムの一つとしては、JNKカスケードの活性化が考えられる。一方、アルツハイマー病、あるいはパーキンソン病などといった神経変性疾患においては、その細胞死のメカニズムとしてアポトーシスがあげられる。

【0016】

したがって、脳で特に高い発現をしているJNK3経路を阻害、遮断することができれば、これら神経変性疾患の治療薬となり得、JNK3経路を選択的に阻害、遮断できる薬剤は副作用の少ない治療薬としての可能性を有しているとの考えの基に鋭意検討を行い、本発明を完成するに至った。

【0017】

即ち、本発明は以下の(1)～(39)の発明に関する。

(1) 配列番号9～14記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号13および14記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつc-Jun N-terminal kinase 3 (以下、JNK3と略す)と結合することのできるポリペプチド。

【0018】

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

【0019】

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつJNK3と結合することのできるポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー クローニング 第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT WO85/00817(1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0020】

(3) 上記(1)または(2)記載のポリペプチドをコードするDNA。

(4) 配列番号2～7記載の塩基配列から選ばれる塩基配列からなるDNA。

(5) 配列番号6または7記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつJNK3と結合することのできるポリペプチ

ドをコードするDNA。

【0021】

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつJNK3と結合することのできるポリペプチドをコードするDNA」とは、上記(3)または(4)記載のDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0 MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mM 塩化ナトリウム、15 mM クエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0022】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー クローニング 第2版、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0023】

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1~7で表される塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

(6) 上記(3)~(5)のいずれか1つに記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

【0024】

(7) 組換え体DNAが、プラスミドpcDNA3-S-JSAP1b、pcDNA3-S-JSAP1c、pcDNA3-S-JSAP4およびpGAD10-JSAP5から選ばれる組換え体DNAである、上記(6)の組換え体DNA。

(8) 上記(6)または(7)の組換え体DNAを保有する形質転換体。

【0025】

(9) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から選ばれる形質転換体である、上記(8)の形質転換体。

(10) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記(9)の形質転換体。

【0026】

(11) Escherichia属に属する微生物が、Escherichia coli JSAP1b/pcDNA3 (FERM BP-6567)、Escherichia coli JSAP1c/pcDNA3 (FERM BP-6568)、Escherichia coli JSAP4/pcDNA3 (FERM BP-6569) およびEscherichia coli JSAP5/pGAD10 (FERM BP-6570) から選ばれる微生物である、上記(10)の形質転換体。

【0027】

(12) 上記(8)～(11)のいずれかに記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(1)または(2)記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、上記(1)または(2)のポリペプチドの製造方法。

【0028】

(13) 上記(3)～(5)および配列番号5記載の塩基配列からなるDNAのいずれか1つに記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

【0029】

(14) 誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌク

レオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、上記(13)のオリゴヌクレオチド。

【0030】

(15) 上記(13)または(14)のオリゴヌクレオチドを用い、上記(1)または(2)のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

(16) 上記(13)または(14)のオリゴヌクレオチドを用い、上記(1)または(2)のポリペプチドの発現を抑制する方法。

【0031】

(17) 上記(1)または(2)のポリペプチドを認識する抗体。

(18) 上記(17)の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)または(2)のポリペプチドの免疫学的検出法。

(19) 上記(17)の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)または(2)のポリペプチドの免疫組織染色法。

【0032】

(20) 上記(17)の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

(21) 配列番号8~14記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号8~14記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつJNK3と結合することのできるポリペプチド、JNK3および被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドとJNK3との結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

【0033】

(22) 配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ JNK3 と結合することのできるポリペプチド、活性化された JNK3 および被験試料とを接触させることを特徴とする、活性化された JNK3 による、該ポリペプチドのリン酸化を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

【0034】

(23) 上記 (21) または (22) の方法により得られる化合物。

(24) 配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ JNK3 と結合することのできるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【0035】

(25) 遺伝子の発現を変動を上記 (15) の方法を用い検出することを特徴とする、上記 (24) のスクリーニング方法。

(26) ポリペプチドを上記 (18) の方法を用い、検出することを特徴とする、上記 (24) のスクリーニング方法。

【0036】

(27) 上記 (24) ～ (26) のいずれか 1 つに記載の方法により得られる化合物。

(28) 配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ JNK3 と結合することのできるポリペプチドと JNK3 との結合阻害剤。

【0037】

(29) 活性化された JNK 3 による、配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 8～14 記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ JNK 3 と結合することのできるポリペプチドのリン酸化阻害剤。

【0038】

(30) 上記 (1) または (2) のポリペプチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

【0039】

(31) 上記 (1) または (2) のポリペプチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

【0040】

(32) 上記 (13) または (14) のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

【0041】

(33) 上記 (13) または (14) のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

【0042】

(34) 上記 (17) の抗体を含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋

萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

【0043】

(35) 上記(17)の抗体を含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

【0044】

(36) 上記(1)または(2)のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

(37) 上記(34)のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

【0045】

(38) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から選ばれる遺伝子である、上記(37)のスクリーニング方法。

(39) 上記(37)または(38)の方法により得られる化合物。

【0046】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

[1] 本発明のDNAの取得およびオリゴヌクレオチドの調製

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

【0047】

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学 9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。

【0048】

全RNAからポリ (A)⁺RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー クローニング 第2版) やオリゴdTラテックスを用いる方法等を用いることができる。

ファースト・トラック・mRNA単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA精製キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することもできる。

【0049】

適切な細胞または組織として、動物の脳細胞または脳組織をあげることができる。

得られた全RNAあるいはmRNAを用い、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

【0050】

cDNAライブラリー作製法として、モレキュラー クローニング 第2版やカレント プロトコールズ イン モレキュラー バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等をあげることができる。

【0051】

cDNAライブラリーを作成するためのクローニングベクターとしては、大腸

菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれも使用できる。

具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (クローンテック社製)、 λ ExCell 1 (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名 pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]、pGAD10 (クローンテック社製) 等をあげることができる。

【0052】

宿主微生物としては、大腸菌 Escherichia coli に属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、Escherichia coli LE392 (モレキュラー クローニング 第2版) 等を用いることができる。

【0053】

上記方法により作製した cDNA ライブラリーに加え、市販の cDNA ライブラリーも利用することができる。

市販の cDNA ライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社、ヘルス サイエンス リサーチ リソース バンク (Health Science Research Resources Bank, Japan) 等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器 cDNA ライブラリーをあげることができる。

【0054】

(2) 本発明の DNA の取得

上記(1)で作製したcDNAライブラリーより、本発明のDNAを有するcDNAクローンを、以下の酵母を用いたツー ハイブリッド システム (two-hybrid system) により取得することができる。

【0055】

JNK3をコードする全長cDNA、例えば、マウスJNK3 [Nature Medicine, 3, 89 (1997)] を、GAL4 DNA結合ドメインをコードする配列を含むクローニングベクター、例えば、pAS2-1 (クローンテック社製)の該配列下に組み込み、酵母CG-1945株 (クローンテック社製) に導入する。

【0056】

上記(1)の方法で、GAL4転写活性化ドメインをコードする配列を含むクローニングベクター、例えば、pGAD10 (クローンテック社製) の該配列下に、脳由来のcDNAを挿入し、cDNAライブラリーを作製する。

該cDNAライブラリーを、上記JNK3を含有するCG-1945株に導入し、形質転換株を取得する。

【0057】

CG-1945株は、GAL4応答配列の制御下にあるHIS3およびlacZ遺伝子を持つレポーター酵母株であり、JNK3および脳cDNAのハイブリッドコンストラクトから発現される2つのタンパク質が結合する時にのみHIS3およびlacZ遺伝子が発現する。従って、得られた形質転換株より、ヒスチジン要求性が解除され (ヒスチジンを含有しない培地で生育してくる) かつβ-ガラクトシダーゼ活性を有する株を選択することにより、JNK3と結合することのできるポリペプチド (JSAP: c-Jun N-terminal kinase / stress-activated protein kinase-associated protein) をコードする本発明のDNAを有するcDNAクローンを選択することができる。

【0058】

ヒスチジン要求性が解除されかつβ-ガラクトシダーゼ活性を有する形質転換株を一度の行程で取得してもよいが、ヒスチジン要求性が解除された形質転換株あるいは形質転換株β-ガラクトシダーゼ活性を有する形質転換株 (一次ポジティブクローン) をまず選択し、次にヒスチジン要求性が解除されかつβ-ガラク

トシダーゼ活性を有する形質転換株（二次ポジティブクローン）を選択し、目的とする形質転換株を取得してもよい。

【 0 0 5 9 】

上記のようにして取得された目的とする形質転換株より、常法に準じて p G A D 由来のプラスミドを回収し、目的とする脳由来の c D N A フラグメントを取得する。

得られた c D N A フラグメントをプローブとして用い、該プローブをアイソトープあるいは蛍光標識し、コロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはプレート・ハイブリダイゼーション法〔モレキュラー クローニング 第2版〕等により、目的とする全長 c D N A を取得することができる。

【 0 0 6 0 】

上記の方法により取得された D N A の塩基配列は、該 D N A 断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいはパーキン・エルマー社 (Perkin Elmer : 3 7 3 A ・ D N A シークエンサー)、ファルマシア社、ライコア (LI-COR) 社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

【 0 0 6 1 】

上記方法により取得される D N A として、例えば、配列番号 1 ～ 7 いずれかに記載の塩基配列からなる D N A をあげることができる。

配列番号 2 に記載の塩基配列からなる D N A を含有するプラスミド p c D N A 3 - S - J S A P 1 b を保有する大腸菌 Escherichia coli JSAP1b/pcDNA3、配列番号 3 に記載の塩基配列からなる D N A を含有するプラスミド p c D N A 3 - S - J S A P 1 c を保有する大腸菌 Escherichia coli JSAP1c/pcDNA3、配列番号 6 に記載の塩基配列からなる D N A を含有するプラスミド p c D N A 3 - S - J S A P 4 を保有する大腸菌 Escherichia coli JSAP4/pcDNA3 および配列番号 7 に記載の塩基配列からなる D N A を含有するプラスミド p G A D 1 0 - J S A P 5 を保有する大腸菌 Escherichia coli JSAP5/pGAD10 は、それぞれ F E R M B P - 6 5 6 7、F E R M B P - 6 5 6 8、F E R M B P - 6 5 6 9、F E R M

B P-6570として、平成10年11月6日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）に寄託されている。

【0062】

また、上記方法で取得したDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト由来の目的とするDNAを取得することができる。

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

【0063】

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJ等の塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。

新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ（FrameSearch）等の相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Prot等のアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

【0064】

（3）本発明のオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、常法あるいは上記のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0065】

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するD

NAをあげることができ、具体的には、配列番号1～7で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。

【0066】

該オリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度 (T_m) および塩基数が極端に変わることのない上記のオリゴヌクレオチドが好ましい。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

【0067】

該誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

【0068】

[2] 本発明のポリペプチドの調製

(1) 形質転換体の作製

上記 [1] に記載の方法により取得したJSAPをコードする本発明のDNA

を宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー クローニング 第2版、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。

【0069】

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0070】

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0071】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のポリペプチド遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0072】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（ファルマシア社製）、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1〔プロメガ(Promega)社〕、pQE-8（キアゲン(QIAGEN)社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）、pTrs32（FERM BP-5408）、pGHA2（FERM BP-400）、pGKA2（FERM B-6798）、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pGEX（

ファルマシア社製)、pET-3 (ノバジェン社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen社製)、pMAL-c2 (New England Biolabs社製) 等をあげることができる。

【0073】

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P trp)、lacプロモーター (P lac)、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター (P trp x 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0074】

リボソーム結合配列としては、シャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0075】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY 3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli H B101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli N Y49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Coryn

ebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

【0076】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法 [Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)] 等をあげることができる。

【0077】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【0078】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

【0079】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c D N A I / A m p (インビトロジェン社製)、p c D N A I、p C D M 8 [Nature, 329, 840 (1987)]、p A G E 1 0 7 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、p R E P 4 (インビトロジェン社製)、p A G E 1 0 3 [Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、p A M o、p A M o A、p A S 3-3 (特開平2-227075) 等が用いられる。

【0080】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の I E (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、S R α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0081】

動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞または Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

【0082】

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)、293等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

【0083】

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 4

56 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

【0084】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、モレキュラー・バイオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0085】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製)等をあげることができる。

【0086】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

【0087】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

【0088】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクタ

ーと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

【0089】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー クローニング 第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

【0090】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

また、患者の生体内から採取した細胞に、適切な本発明のポリペプチドを発現させるための発現ベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、本発明のポリペプチドを患者の生体内で発現させることもできる。

【0091】

(2) 形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0092】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

【0093】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

【0094】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0095】

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0096】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添

加した培地等を用いることができる。

【0097】

培養は、通常 pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0098】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーマンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRH バイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製〕、Grace's Insect Medium [Nature 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0099】

培養は、通常 pH 6～7、25～30℃等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

【0100】

例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

【0101】

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF

(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0102】

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。

【0103】

該可溶化液を、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0104】

本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0105】

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いる

アフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

【0106】

また、本発明のポリペプチドを F l a g ペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗 F l a g 抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

【0107】

更に、本発明のポリペプチドは、F m o c 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、t B o c 法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。

また、アドバンスト・ケムテック (Advanced ChemTech) 社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント (Protein Technology Instrument) 社、シンセセル・ベガ (Synthecell-Vega) 社、パーセプティブ (PerSeptive) 社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0108】

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、タンパク質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。

〔3〕 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

（1）ポリクローナル抗体の調製

上記〔2〕に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

【0109】

抗原とするペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列に基づいてペプチド合成機で合成することもできる。

また、上記〔2〕に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドを、後述

の活性化 JNK 3 を用いてリン酸化したポリペプチドの全長またはリン酸化部分を含む部分ポリペプチド断片の精製標品を抗原として用い、動物に投与することにより、リン酸化された本発明のポリペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体を作製することができる。

【0110】

リン酸化された本発明のポリペプチドとしては、例えば、配列番号 8 記載のアミノ酸配列の 234、244 および 255 番目のアミノ酸のいずれか 1 つ以上をリン酸化されたもの、配列番号 9 記載のアミノ酸配列の 243、253 および 264 番目のアミノ酸のいずれか 1 つ以上をリン酸化されたもの、配列番号 10 記載のアミノ酸配列の 266、276 および 287 番目のアミノ酸のいずれか 1 つ以上をリン酸化されたもの、配列番号 11 記載のアミノ酸配列の 265、275 および 286 番目のアミノ酸のいずれか 1 つ以上をリン酸化されたものをあげることができる。

【0111】

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20 週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物 1 匹当たり 50～100 μ g が好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。

【0112】

該抗原の投与は、1 回目の投与の後 1～2 週間おきに 3～10 回行う。各投与後、3～7 日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (ELISA 法) : 医学書院刊 1976 年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)〕等で確認する。

【0113】

免疫に用いた抗原に対し、該血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得す

ることができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]、またはDEAEセファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

【0114】

(2) モノクローナル抗体の調製

(2-1) 抗体産生細胞の調製

上記(1)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

【0115】

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0116】

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH 7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

【0117】

(2-2) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495

(1975)]等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地

〔RPMI-1640培地にグルタミン (1.5mM)、2-メルカプトエタノール (5×10^{-5} M)、ジェンタマイシン ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ($15 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

【0118】

(2-3) ハイブリドーマの作製

(2-1) で取得した抗体産生細胞と (2-2) で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞 = 5~10 : 1 になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0119】

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7ml を混合した溶液を 0.2~1ml 添加し、更に1~2分間毎にMEM培地 1~2ml を数回添加する。

【0120】

添加後、MEM培地を加えて全量が50mlになるように調製する。

該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} M)、チミジン (1.5×10^{-5} M) およびアミノプテリン (4×10^{-7} M) を加えた培地〕100ml中に懸濁する。

【0121】

該懸濁液を96穴培養用プレートに $100 \mu\text{l}$ / 穴ずつ分注し、5% CO_2 インキュベーター中、37℃で7~14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter14 (1988)] 等に述べられている酵素免疫測定法により、上記抗体産生細胞を取得するために、免疫に用いた抗原に特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0122】

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(2-4)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0123】

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目はHT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

【0124】

(2-4)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(2-3)で取得した本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0125】

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナ

ル抗体を精製、取得することができる。

【0126】

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。タンパク質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

[4] JNK3と結合することのできる新規ポリペプチドを用いた、有用医薬品のスクリーニング法

(1) スクリーニング法に用いるタグポリペプチドと本発明のポリペプチドとの融合ポリペプチドの調製

1) チオレドキシンSタグ (thioredoxin·S-tag、以下、Trx·Sと略す) ペプチドとの融合ポリペプチドの調製

上記[1]で取得されるJNK3と結合することのできるポリペプチド(JSAP)をコードするcDNAの全長あるいは部分長DNAを、Trx·S配列を含む発現ベクター、例えば、pET32 (Novagen社製)のTrx·S配列の下流に挿入することにより、Trx·S-JSAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。同様に、Trx·S-ATF2配列を含む発現ベクター、例えば、pET32a (Novagen社製)のTrx·S-ATF2配列の下流に挿入することにより、Trx·S-ATF2-JSAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

【0127】

得られた発現ベクターを用い、上記[2]に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。

2) Sタグ (S-tag) ペプチドとの融合ポリペプチドの調製

JSAPをコードするcDNAの全長あるいは部分長DNAを、Sタグ配列を含む発現ベクター、例えば、pcDNA3 (Invitrogen社製)にSタグ配列を挿入したs-modified pcDNA3のSタグ配列の下流に挿入することにより、S-JSAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

【0128】

得られた発現ベクターを用い、上記[2]に記載の方法に準じて融合ポリペ

チドを取得することができる。

3) GAL4ADペプチドとの融合ポリペプチドの調製

J SAPをコードするcDNAの全長あるいは部分長DNAを、GAL4AD配列を含む発現ベクター、例えば、pGAD10 (Clontech社製) のGAL4AD配列の下流に挿入することにより、GAL4AD-J SAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

【0129】

得られた発現ベクターを用い、上記〔2〕に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。

4) Flagペプチドとの融合ポリペプチドの調製

J SAPをコードするcDNAの全長あるいは部分長DNAを、Flag配列を含む発現ベクター、例えば、pFlag-CMV-2 (Kodak社製)、pcDNA3にFlagタグ配列を挿入したFlag-modified pcDNA3 vector (Invitrogen社製) のFlag配列の下流に挿入することにより、Flag-J SAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

【0130】

得られた発現ベクターを用い、上記〔2〕に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。

5) グルタチオン S-トランスフェラーゼ (Glutathione S-transferase、以下、GSTと略す) との融合ポリペプチドの調製

J SAPをコードするcDNAの全長あるいは部分長DNAを、GST配列を含む発現ベクター、例えば、pGEX (Pharmacia社製) あるいはpGEX-3X (Pharmacia社製) のGST配列の下流に挿入することにより、GST-J SAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

【0131】

得られた発現ベクターを用い、上記〔2〕に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。該融合ポリペプチドはGlutathione Sepharose 6B (Pharmacia社製) カラム (Pharmacia社製) を用いて精製することができる。

6) Mycタグペプチドとの融合ポリペプチドの調製

J S A P をコードする c D N A の全長あるいは部分長 c D N A を、M y c タグ配列を含む発現ベクター、例えば、Myc-modified pcDNA3 [M y c タグコード配列を該遺伝子の上流につなぎ、タグを付加した該タンパク質を発現させるように改変した p c D N A 3 (Invitrogen社製)] の M y c タグ配列の下流に挿入することにより、M y c - J S A P 融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

【0132】

得られた発現ベクターを用い、上記 [2] に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。

7) H i s - S タグペプチドとの融合ポリペプチドの調製

J S A P をコードする c D N A の全長あるいは部分長 c D N A を、H i s - S タグ配列を含む発現ベクター、例えば、His-S-modified pcDNA3 [H i s - S タグコード配列を該遺伝子の上流につなぎ、タグを付加した該タンパク質を発現させるように改変した p c D N A 3 (Invitrogen社製)] の H i s - S タグ配列の下流に挿入することにより、M y c - J S A P 融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

【0133】

得られた発現ベクターを用い、上記 [2] に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。

上記 1) ~ 7) の方法に準じ、MAP キナーゼカスケードに関わるポリペプチドとの融合ポリペプチドを同様に調製することができる。

【0134】

(2) 活性化 J N K 3 の調製

上記 [4] (1) の方法に準じ調製した F l a g - J N K 3 全長あるいは部分長をコードする D N A を p F l a g - C M V - 2 に組み込んだベクターを作製する。

また Δ M E K K 1 (M E K K 1 の 1 1 6 9 - 1 4 8 8 アミノ酸残基を含むペプチドであり恒常的に活性化されている M E K K 1) をコードする D N A を発現ベクター p E F - B O S に組み込む。

【0135】

得られた両発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1 (Mirus社製) を用いてトランスフェクションし、常法に準じて、COS-7細胞を培養し、Flag-JNK3融合ポリペプチドおよびΔMEKK1を、一過性に発現させる。

培養24-48時間後、細胞を緩衝液B [50mM HEPES (pH7.5)、150mM NaCl、1% NP-40、10% glycerol、2mM MgCl₂、1mM EGTA、20mM β-glycerophosphate、2mM Na₃VO₄、1mM PMSF、0.2mM DTT] に溶解し、抗Flag抗体カラム (Kodak社製) で活性化Flag-JNK3精製する。

【0136】

該活性化Flag-JNK3は、20~50%グリセリンを含有した緩衝液あるいはグリセリンを含まない緩衝液中、-20℃~-80℃で保存することが可能で、使用時に解凍して用いることができる。

(3) JNK3結合活性を指標としたスクリーニング系

JNK3と、上記[2]で取得した各JSAPとの結合を阻害する活性を有する化合物を見出すことにより、JNK3経路を阻害することができるためアポトーシス等のJNK3経路に起因する疾患の予防、治療に有用である。

【0137】

以下、各JSAPとJNK3との結合を阻害する活性を有する化合物をスクリーニングする方法について詳述する。

1) スクリーニング系1 (培養細胞を用いる方法)

上記[4](1)の方法に準じ調製したS-JSAP発現ベクターと、Flag-JNK3発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1 (Mirus社製) を用いてトランスフェクションし、常法に準じて、被検化合物添加または無添加の条件下で、COS-7細胞を培養し、S-JSAPおよびFlag-JNK3融合ポリペプチドを、一過性に発現させる。

【0138】

培養24-48時間後、該培養細胞を緩衝液Bに溶解し、Sプロテインアガロース (S-protein agarose) を添加し、S-JSAPおよびS-JSAPと結合するポリペプチドを沈降させ回収する。

該回収ポリペプチド画分を SDS-PAGE で展開し、メンブレン Immobilon-P (Millipore 社製) にトランスファーする。

【0139】

該メンブレンおよびプローブとして anti-Flag M5 monoclonal 抗体 (Kodak 社製) を用いウエスタンブローディングを行い、該抗体と結合するポリペプチド (Flag-JNK3) を ECL 検出システム (Amersham 社製) で可視化し、JSAP と結合している JNK3 量を定量化する。

【0140】

該方法により、被検化合物を入れていない場合の値をコントロールとして、JNK3 との結合を阻害する化合物を検出することができる。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在するタンパク質、人工的に合成されたタンパク質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物 (例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等) の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。後述のスクリーニング法においても、被験試料として同様のものを用いることができる。

【0141】

2) スクリーニング系 2 (ELISA 法)

上記 [4] (1) の方法に準じ調製した GST-JSAP 融合ポリペプチドをそのまま、あるいはプロテアーゼ factor Xa (Sigma 社製) で切断した JSAP ポリペプチド断片を結合反応に使用する。以下、これらポリペプチドを JSAP 関連ポリペプチドと呼ぶ。

【0142】

該ポリペプチドは使用時まで、 -20°C から -80°C でグリセリンを 20~50% 含有した緩衝液あるいはグリセリンを含まない緩衝液で保存することができ、使用時に解凍して用いる。

上記 JSAP 関連ポリペプチドを 96 穴プレートに添加する。

【0143】

〔4〕（2）で調製した活性化 JNK3、または活性化 JNK3 および被検化合物を、緩衝液、例えば、結合用緩衝液 [binding buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.5% NP-40] に添加し、攪拌する。

【0144】

得られた攪拌液を上記プレートに添加する。

添加後、4℃で1～2時間放置する。

放置後、プレートを同緩衝液で3回洗浄し、残存する活性化 JNK3 を、ELISA法で定量する。

【0145】

即ち、1次抗体として、例えば、活性化 JNK3 を認識することのできる Phospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)抗体 (New England Biolabs社製) を使用し、2次抗体として上記抗体を認識することのできる抗体を用い、ELISA法で残存活性化 JNK3 量を定量することができる。

【0146】

該方法により、被検化合物を入れていない場合の値をコントロールとして、JNK3 との結合を阻害する化合物を検出することができる。

（4）JNK3 による JSAP1 のリン酸化を指標としたスクリーニング系

後述の実施例より得られた、a)～c) の知見より、JSAP1 のリン酸化を阻害する活性を有する化合物をスクリーニングする方法を確立することは、JNK3 経路に起因する疾患の予防、治療に有用な化合物を検出する上で重要である。

【0147】

a) 活性化されていない JNK3 は、脳に選択的に発現しているスキャフォールドポリペプチド JSAP1 a、b、c、d に結合している。

b) TNF- α 、IL-1、EGF、LPS 等の細胞外の種々のストレスにより、JNK3 経路が活性化 (MAPKKK \rightarrow MAPKK \rightarrow JNK3) されると、JNK3 そのものが活性化 (リン酸化) され、活性化された JNK3 は JSAP1 a、b、c、d をリン酸化する。

【0148】

c) JNK3はJSAP1をリン酸化後、JSAP1から解離し、核内へ移行する。

核内へ移行したJNK3は種々の転写因子を活性化して、その細胞をアポトーシスなどへ導くと考えられる。従って、このJNK3によるJSAP1のリン酸化を阻害する活性を有する化合物を見出せば、JNK3経路を阻害することができ、アポトーシス等のJNK3経路に起因する疾患の予防、治療に有用である。

【0149】

以下、JNK3によるJSAP1のリン酸化を阻害する活性を有する化合物をスクリーニングする方法について詳述する。

1) スクリーニング系 (cell-free系)

1) -1 スクリーニング系1 (ラジオアイソトープを使用する方法)

① [4] (1) に記載の方法に準じて調製したGST-JSAP1あるいはJSAP1、および② [4] (2) に記載の方法に準じて調製した活性化JNK3、または活性化JNK3および被検化合物を、緩衝液、例えば、緩衝液A [20 mM HEPES、10 mM MgCl₂、5 mM β-mercaptoethanol、0.1 mg/ml BSA (pH 7.4)] に添加、混合し、スクリーニング試験液を調製する。該スクリーニング試験液を96穴プレートに添加する。

【0150】

添加後、該プレートに[γ-³²P]ATPあるいは[γ-³³P]ATPを添加する。5～30分間反応後、50 mM EDTAを添加して反応を停止する。

反応停止後、反応液中のポリペプチドを、96ウェルニトロセルロースメンブレプレート、96ウェルホスホセルロースメンブレプレート、あるいは96ウェルPVDFメンブレプレートの各ウェルのメンブレンに、吸引ろ過によりトラップし、該メンブレンを同緩衝液で吸引洗浄する。

【0151】

該メンブレンを液体シンチレーター Microscint-20 (Packard社製) に入れ、メンブレン上の³²Pあるいは³³P放射活性をTop count (Packard社製) でカウントする。

該方法により、被検化合物を入れていない場合のカウントをコントロールとして、JNK3によるJSAP1のリン酸化を阻害する活性を有する化合物を検出することができる。

【0152】

1) - 2 スクリーニング系2 (ELISA法)

[3]に記載した方法に準じて取得したJSAP1を認識する抗体(1次抗体)を、96穴プレートにコートする。

上記1) - 1に記載した方法に準じて調製したスクリーニング試験液に、ATPを50 μ M添加する。

【0153】

添加後、室温で5~60分間反応を行い、0.25N HClで反応を停止する。

停止後、0.25N NaOH/0.1M Tris-HCl (pH8.0)で中和する。

【0154】

該中和液の一部一定量を、上記1次抗体でコートしたプレートに添加し、放置する。

放置後、プレートを同緩衝液で洗浄し、[3]に記載した方法に準じて取得したリン酸化されたJSAP1を認識する抗体(2次抗体)を添加する。

【0155】

常法により2次抗体の量をELISAで定量することにより、リン酸化されたJSAP1の量を定量する。

該方法により、被検化合物を入れていない場合のリン酸化されたJSAP1の量をコントロールとして、JNK3によるJSAP1のリン酸化を阻害する活性を有する化合物を検出することができる。

【0156】

上記1) - 1および1) - 2の方法により取得される、本発明のポリペプチドとJNK3との結合を阻害する化合物またはJSAP1のリン酸化を阻害する活性を有する化合物は、治療薬として単独で用いることが可能ではあるが、通常は

薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として用いることが望ましい。

【0157】

該治療薬の投与方法としては、治療に際し最も効果的な方法を使用することが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与による方法を用いることができる。

該治療薬の剤形としては、軟膏剤、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、テープ剤等をあげることができる。

【0158】

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等をあげることができる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造することができる。

【0159】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用い製造することができる。

【0160】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製することができる。

座剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製することができる。

【0161】

噴霧剤は、上記で取得されたリン酸化阻害剤または結合阻害剤をそのまま噴霧剤として用いることが可能であるが、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製した噴霧剤が好ましい。

【0162】

担体として、具体的には乳糖、グリセリン等を例示することができる。

上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニスト、および担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤を調製することが可能である。

これらの非経口剤においても、経口剤で添加剤として例示した成分を添加することができる。

【0163】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

[5] 本発明のポリペプチドの発現を調節する化合物（以下、発現調節化合物と略す）の探索および同定

(1) 本発明の抗体を用いた発現調節化合物の探索および同定

本発明のポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明の抗体を用いることにより、その細胞中、細胞培養上清中に存在する発現調節化合物を探索、同定することができる。

【0164】

細胞としては、本発明のポリペプチドを発現している細胞、細胞株、組織ならばいかなるものでも用いることができる。

また、[3]に記載した抗体により免疫学的に検出する方法を用い、該ポリペプチドの発現が認められた細胞、細胞株あるいは組織を用いることができる。

【0165】

好適な細胞株として、例えば、レチノイン酸で神経細胞様に分化させたマウス由来 P19細胞(ATCC: CRL-1825)をあげることができる。

被験試料としては、上記〔4〕の被験試料であげたものを用いることができる。

【0166】

本発明のポリペプチドを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞と接触させた後、本発明の抗体を用い、該細胞が発現したポリペプチド含量を定量する。抗体を用いて定量する方法としては、例えば下記の免疫細胞染色を利用した方法をあげることができる。

【0167】

培養付着細胞をPBS緩衝液で洗浄し、0.05% トリプシン、0.02% EDTA(エチレンジアミン4酢酸)を含むPBS緩衝液3mlを加え、余分な溶液を除いた後、37℃、5分間インキュベートすることによりフラスコより細胞を剥がす。

【0168】

浮遊細胞については培養細胞をそのまま用いることができる。

免疫細胞染色を行う細胞を免疫細胞染色用緩衝液(1% BSA、0.02% EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含むPBS)等に懸濁し、 $1 \sim 20 \times 10^5$ 個ずつ丸底96穴プレートに分注する。

【0169】

該プレートに、本発明のモノクローナル抗体を分注する。

モノクローナル抗体としては、〔3〕(2-3)で取得した本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清、〔3〕(2-4)で取得した精製モノクローナル抗体をあげることができる。更に、該モノクローナル抗体を標識した抗体も用いることができる。

【0170】

モノクローナル抗体を標識した抗体としては、例えばビオチン標識した抗体をあげることができる。

ビオチン標識した抗体は公知の方法(酵素抗体法：学際企画刊1985年)で調製することができる。

【0171】

上記抗体を、免疫細胞染色用緩衝液あるいは10%動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて0.1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように希釈する。

該希釈抗体を20~500 $\mu\text{l}/\text{穴}$ となるように分注し、氷冷下で30分間放置する。

【0172】

標識されていない抗体を用いた場合には、上記プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を洗浄後、FITC (fluorescein isothiocyanate) あるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは抗ラットイムノグロブリン抗体を0.1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を50~500 $\mu\text{l}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。

【0173】

ビオチン標識した該モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートにFITCあるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識したストレプトアビジンを50~500 $\mu\text{l}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。

両ケースとも、放置後、プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を良く洗浄し、蛍光顕微鏡、セルソーター等により解析する。

【0174】

上記において被験試料を添加せず、同様の操作を行い、得られた解析結果と、被験試料を添加して得られた解析結果とを比較し、本発明のポリペプチド含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

【0175】

(2) 本発明のポリペプチド遺伝子の転写産物定量系を用いた探索および同定

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞を被験試料と接触させた後、該mRNA含量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

【0176】

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現す

る細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現した該 mRNA の含量を、通常のノーザンハイブリダイゼーション法、RNA のドットブロットハイブリダイゼーション法、RT-PCR 法等を用い定量する。

【0177】

ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよび RT-PCR 法等に用いることのできるプライマーとして、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子断片をあげることができる。

具体的には、配列番号 1～7 記載の塩基配列中の連続した 5～60 塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを好適に用いることができる。

【0178】

上記において被験試料を添加せず、同様の操作を行い、得られた定量結果と、被験試料を添加して得られた定量結果とを比較し、本発明のポリペプチドをコードする mRNA 含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

【0179】

(3) レポーター遺伝子を用いた探索および同定

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域（以下、転写制御領域と略す）の下流にレポーター遺伝子の連結された DNA を含むプラスミドで形質転換された形質転換体と被験試料とを接触させた後、レポーター遺伝子によりコードされたポリペプチドの発現量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

【0180】

転写制御領域は、通常、遺伝子の 5' 上流に含まれることが多い。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の 5' 上流領域は、例えば Genome Walker kits (Clontech 社製) 等を用いて調製することができる。また、該領域を適当な制限酵素を用い、適切な長さに切断した断片を転写制御領域として用いることができる。

【0181】

レポーター遺伝子としては、該遺伝子の翻訳産物が細胞内で安定であり、該翻訳産物の存在量が容易に定量できるものであればいかなるものでも用いることができ、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 β -ガラクトシダーゼ(β -gal)、ルシフェラーゼ(luc)、グリーンフルオレッセントプロテイン(GFP)等をあげることができる。

【0182】

該転写制御領域を含むレポータープラスミドを導入する宿主細胞としては、いかなる細胞も用いることができるが、好適には、[5](1)記載の本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドmRNAの発現が認められている細胞株を用いることができる。

【0183】

被験試料として、上記[4]のものを用いることができる。

転写制御領域の下流に常法によりレポーター遺伝子を連結し、作製したプラスミドを用い、常法により宿主細胞を形質転換する。

また、ポジティブセレクション用マーカー(G418耐性遺伝子等)およびネガティブセレクション用マーカー(単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼやジフテリア毒素Aフラグメント遺伝子等)をつないだジーンターゲティングベクターを作成し、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の一部をレポーター遺伝子で置換した細胞株を作成することもできる[Nature, 336, 348 (1988)、Analytical Biochemistry, 214, 77 (1993)、Gene Targeting, The Practical Approach Series, IRL Press (1993)]。

【0184】

該形質転換体を、例えば該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現したレポーター遺伝子にコードされたポリペプチドの量を、該ポリペプチドに適した方法で検出、定量する。

【0185】

検出、定量法として、CATの場合には、例えば、モレキュラー クローニン

グ 第2版, 16章, 60頁に記載の方法を、 β -gal の場合には、例えば、モレキュラー クローニング 第2版, 16章, 66頁に記載の方法を、luc の場合には、例えば、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法, 81 (1994)に記載の方法を、GFP の場合には、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4653 (1997)記載の方法等をあげることができる。

【0186】

上記において被験試料を添加せず、同様の操作を行い、得られた定量結果と、被験試料を添加して得られた定量結果とを比較し、レポーター遺伝子にコードされたポリペプチド含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

【0187】

[6] 本発明のDNA、ポリペプチド、抗体、結合阻害剤、リン酸化阻害剤および発現調節化合物の利用

(1) 本発明のDNAは、該DNAをプローブとして用いて、ヒトの組織やヒト由来の細胞から[1] (1)と同様にして抽出したRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、その組織や細胞における本発明のポリペプチド遺伝子のmRNAを検出あるいは定量することができる。各種の組織でそのmRNAの発現量を比較することにより本発明のポリペプチドの組織発現分布を知ることができる。

【0188】

(2) 本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のDNAの特異的プライマーとして用いて、ヒトの組織やヒト由来の細胞から[1] (1)と同様にして抽出したRNAについてRT-PCR [reverse transcription PCR; PCR Protocols (1990)]を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの検出や定量を行うことができる。

【0189】

該mRNAを定量する方法は、本遺伝子が関与する病態の診断に用いることができる。

各種病態モデル動物において、該mRNAを定量することにより、病態におけ

る該遺伝子産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該 mRNA の発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

【0190】

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドは、これをプローブとして用いて、ヒトの組織切片に対して in situ ハイブリダイゼーション [Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)] を行うことにより、組織内での本発明のポリペプチドの発現細胞の特定等、より細かい発現分布を知ることができる。

【0191】

これらの方法によって得られる、本発明のポリペプチドがどのような組織や細胞で発現しているかに関する情報および細胞がどのような刺激を受けたときに発現量に変化するかに関する情報は、本発明のポリペプチドの生理機能や病態への関与を解析するために有用である。

【0192】

(4) 本発明の DNA をプローブとして用い、ゲノム DNA に対してサザンハイブリダイゼーション (モレキュラー クローニング 第2版) を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出することができる。

変異の検出を行うことにより、該遺伝子の変異が原因となっている可能性のある、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の診断を行うことができる。

【0193】

(5) 本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド (RNA/DNA) を用い、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写もしくは mRNA の翻訳を抑制することにより [化学, 46, 681 (1991)、Bio/Technology, 9, 358 (1992)]、該遺伝子が発症に関与している可能性のある、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の疾患の予防や治療に用いることができる。

【0194】

上述のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするDNAの配列番号1～7の塩基配列中の連続した5～60塩基と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳開始領域にある5～60塩基と相補的な塩基配列を基にして設計・調製し、生体内に投与する。

【0195】

本発明のDNAを含有する医薬は、上記【4】の本発明のポリペプチドのリン酸化阻害剤または結合阻害剤の医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記【4】の場合と同様の方法で投与することができる。

【0196】

(6) 本発明のDNAを用い、【2】記載の方法により本発明のポリペプチドを取得することができる。

本発明のポリペプチドの用途としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬または予防薬が考えられる。

【0197】

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、上記【4】の本発明のポリペプチドのリン酸化阻害剤または結合阻害剤の医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記【4】の場合と同様の方法で投与することができる。

【0198】

(7) 本発明のオリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖としてレトロウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス等のウィルスベクター、その他のベクターに組み込んで遺伝子治療用ベクターとして、遺伝子治療に用いることができる。

【0199】

(8) 本発明のポリペプチドを抗原として用い、[3]記載の方法により本発明のポリペプチドに対する抗体を製造することができる。

本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量することができる。

【0200】

具体的にはマイクロタイタープレートを用いるELISA法、酵素標識抗体法や蛍光抗体法による免疫組織染色、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

具体的には、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、 ^{125}I 等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体を用いるラジオイムノアッセイ法等をあげることができる。

【0201】

また、本発明の抗体は病理組織切片を用いた免疫組織染色にも利用できる。

本発明の抗体を用い、健常者および被験者の細胞または組織に存在する本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、その量を健常者と被験者とで比較し、発現量に変化しているかどうかを調べることにより、被験者の神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病など）、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、てんかん、各種の免疫、炎症性疾患の診断に用いることができる。

【0202】

(9) 本発明のポリペプチドの機能（JNK3 スキャフォールド ポリペプチドあるいはJNK3によるリン酸化基質、あるいはJNK3との結合）を阻害する抗体を投与することにより、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防、治療が可能となる。

【0203】

本発明の抗体を含有する医薬は、上記[4]の本発明のポリペプチドのリン酸化阻害剤または結合阻害剤の医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製するこ

とができ、調製された該医薬製剤を上記〔4〕の場合と同様の方法で投与することができる。

【0204】

(10) 本発明のリン酸化阻害剤、結合阻害剤および本発明のポリペプチド遺伝子の発現を調節する化合物は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防、治療として用いることができる。

【0205】

【実施例】

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

下記実施例における遺伝子操作的手法は、特に断らない限りモレキュラー クローニング 第2版に記載されている常法に準じて行った。

【0206】

実施例1 JNK3と結合する活性を有するポリペプチドをコードするcDNAのクローン化

(1) マウス脳由来cDNAライブラリーからのクローン化

マウスJNK3 [Nature Medicine, 3, 89 (1997)] をコードする全長cDNAを、GAL4 DNA結合ドメインをコードする配列を含むクローニングベクターpAS2-1 (Clontech社製) のNcoI-BamHIサイトに組み込み(pAS2-1-JNK3)、酵母CG-1945 (Clontech社製) に導入した。

【0207】

GAL4 転写活性化ドメインをコードする配列を含むクローニングベクターpGAD10 マウス脳cDNA ライブラリー (Clontech社製) を、上記pAS2-1-JNK3を導入した酵母に導入し、形質転換酵母を取得した。

該形質転換酵母より、ヒスチジン要求性がなくなった株 (ヒスチジンを含有しない培地で生育してくる)、またはβ-ガラクトシダーゼ活性を有する株を選択した (一次ポジティブクローン)。

【0208】

得られた一次ポジティブクローンより、ヒスチジン要求性がなく、かつ β -ガラクトシダーゼ活性を有するクローンを選択した（二次ポジティブクローン）。

得られたクローンから pGAD10 由来のプラスミドを回収した。

【0209】

その結果、上記酵母による two-hybrid system により、マウス脳 cDNA ライブラリーより、配列の異なる 4 種類の部分長 cDNA フラグメントを取得した。

これら得られたフラグメントをプローブとして利用し、常法により λ ZAPII マウス脳 cDNA ライブラリー (Clontech 社製) をスクリーニングすることにより、JNK3 と結合することのできるポリペプチド (JSAP) である、JSAP1a、JSAP1b、JSAP1c、JSAP1d、JSAP3、JSAP4 および JSAP5 をコードする 7 種類の cDNA クローンを取得した。

【0210】

JSAP1a、JSAP1b、JSAP1c、JSAP1d、JSAP3 および JSAP4 をコードする cDNA は全長 cDNA として取得されたが、JSAP5 をコードする cDNA は部分長の cDNA として取得された。

JSAP1a、JSAP1b、JSAP1c、JSAP1d、JSAP3 または JSAP4 をコードする cDNA にはそれぞれ、3,918bp、3,945bp、4,014bp、4,011bp、1,293bp、4,527bp のオープンリーディングフレーム（以下、ORF と略す）が存在し、それぞれ、1305 残基、1314 残基、1337 残基、1336 残基、1508 残基のアミノ酸残基をコードしていることが分かった（配列番号 1～6）。

【0211】

また JSAP1a、JSAP1b、JSAP1c、JSAP1d は同一の遺伝子由来のスプライスバリエーションであった。即ち、JSAP1a において、27bp の塩基配列が挿入されたものが JSAP1b、3bp および 93bp の塩基配列が挿入されたものが JSAP1c、93bp の塩基配列が挿入されたものが JSAP1d であった。

【0212】

具体的には、J S A P 1 b の挿入箇所は、配列番号 9 の 201 番目のセリン残基から 209 番目のセリン残基の 9 残基のアミノ酸をコードする 27 b p の DNA 配列部、J S A P 1 c の挿入箇所は、配列番号 10 の 201 番目のセリン残基をコードする 3 b p の DNA 配列部および 219 番目のバリン残基から 249 番目のグルタミン残基をコードする 31 残基のアミノ酸をコードする 93 b p の DNA 配列部、J S A P 1 d の挿入箇所は、配列番号 11 の 218 番目のバリン残基から 248 番目のグルタミン残基の 31 残基のアミノ酸をコードする 93 b p の DNA 配列部である。

【0213】

J S A P 1 a は既に公知の配列〔1997年日本分子生物学会（12月）〕と一致していた。

J S A P 3 は、human C-terminal-binding protein 1 (C t B P) [EMBO J., 17, 5129 (1998)] のマウスホモログであると推定された。

【0214】

J S A P 4 にはアミノ酸配列中の 87~121 番目のアミノ酸残基、341~373 番目のアミノ酸残基、658~690 番目のアミノ酸残基、700~732 番目のアミノ酸残基には、WD40-repeat と呼ばれる配列が見られた。

この配列は他のタンパク質との相互作用（結合）に関与し得ることが予想され、また G-プロテイン (G-protein) といった、細胞内情報伝達を担う分子中にもみられる [FEBS Lett., 307, 131 (1994)]。後述の実施例より J N K 3 経路において、情報伝達に重要な機能を有していることが明らかとなった。

J S A P 5 をコードする c D N A は配列番号 7 に示した、734 b p よりなる DNA であった。この c D N A には開始、および終止コドンがなく、部分長であることがわかった。該 c D N A は 244 アミノ酸残基をコードしていた（配列番号 14）。

【0215】

(2) J S A P の性質の解析に用いる種々のポリペプチドおよび該ポリペプチドを発現するベクターの調製

J N K 3 に結合することのできる上記で取得されたポリペプチド J S A P の機

能を解析するために、下記のポリペプチドおよび該ポリペプチドを発現するベクターを調製した。

【0216】

1) チオレドキシンSタグ (thioredoxin·S-tag、以下、Trx·Sと略す) ペプチドとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製

JNK1、JNK2、JNK3およびSEK1のcDNAはλZAPIIマウス脳cDNAライブラリー (Clontech社製) より、MEKK1 cDNAはλZAPIIマウス脾臓cDNAライブラリー (Clontech社製) から常法により取得した。

【0217】

c-Raf1 cDNAはHealth Science Research Resources Bank, Japan提供のcDNAライブラリーから取得した。

ヒトリンバ球由来のMKK6、p38、ERK2、c-Jun (1-79) およびATF2、マウス胸腺由来のMEK1、MKK7およびCdc42のcDNAをPCR法を用いることにより取得した。

【0218】

得られた各々のcDNAをpET32a (Novagen社製) のTrx·S配列の下流に挿入し、Trx·S-JNK1、Trx·S-JNK2、Trx·S-JNK3、Trx·S-SEK1、Trx·S-MEKK1、Trx·S-c-Raf1、Trx·S-MKK6、Trx·S-p38、Trx·S-ERK2、Trx·S-c-Jun、Trx·S-ATF2、Trx·S-MEK1、Trx·S-MKK7またはTrx·S-Cdc42を発現するベクターを各々作製した。

【0219】

上記(1)で取得したJSAPをコードするDNAまたは該DNAの断片を、発現ベクターpET32a (Novagen社製) のTrx·S配列の下流に存在する下記制限酵素サイトに挿入し、Trx·S-JSAP1a、Trx·S-JSAP1b、Trx·S-JSAP1c、Trx·S-JSAP1d、Trx·S-JSAP3、Trx·S-JSAP4、Trx·S-JSAP5を発現するベクターを各々作製した。

【0220】

挿入した各DNAのコードするポリペプチドおよび各挿入制限酵素サイトは以下の通りである。

- J S A P 1 a (115~274アミノ酸残基) : NcoI-BamHIサイト
- J S A P 1 a (115~504アミノ酸残基) : EcoRIサイト
- J S A P 1 a (268~486アミノ酸残基) : NcoIサイト
- J S A P 1 a (486~744アミノ酸残基) : NcoI-BamHI
- J S A P 1 a (744~1194アミノ酸残基) : BamHIサイト
- J S A P 1 b (115~283アミノ酸残基) : NcoI-BamHIサイト
- J S A P 1 c (115~306アミノ酸残基) : NcoI-BamHIサイト
- J S A P 1 d (115~305アミノ酸残基) : NcoI-BamHIサイト
- J S A P 3 (全長) : EcoRI-SalIサイト
- J S A P 4 (1042~1331アミノ酸残基) : EcoRI-HindIIIサイト
- J S A P 5 (部分長) : EcoRIサイト

また、ATF2の1~107アミノ酸残基をコードするDNAおよびATF2の1~116アミノ酸残基をコードするDNAを、発現ベクターpET32a (Novagen社製) のTrx・S配列の下流にあるBamHI-XhoI、BamHI-XhoIサイトにそれぞれ挿入し、Trx・S-ATF2 (1-107アミノ酸残基)、Trx・S-ATF2 (1-116アミノ酸残基) を調製した。

【0221】

2) Flagペプチドとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製

JNK1、JNK2、JNK3、ERK2またはp38をコードする全長のcDNAを哺乳動物発現ベクターpFlag-CMV-2 (Kodak社製) のFlag配列の下流に存在するNotI-BamHIサイトにそれぞれ挿入し、Flag-JNK1、Flag-JNK2、Flag-JNK3、Flag-ERK2またはFlag-p38を発現するベクターを各々作製した。

【0222】

また、下記ポリペプチドをコードするDNAを、Flag-modified pcDNA3 vectorのFlag配列の下流に存在する下記制限酵素サイトに挿入し、Flag-S

EK1、Flag-MKK6、Flag-MKK7、Flag-MEK1、Flag-MEKK1、Flag-c-Raf1、Flag-Raf-C、Flag-MEKK-N、Flag-TAK1を発現するベクターを各々作製した。

【0223】

挿入した各DNAのコードするポリペプチドおよび各挿入制限酵素サイトは以下の通りである。

SEK1 (全長) : HindIII-XbaI サイト

MKK6 (全長) : HindIII-XbaI サイト

MKK7 (全長) : HindIII-XbaI サイト

MEK1 (全長) : HindIII-XbaI サイト

MEKK1 (全長) : BamHI-EcoRV サイト

c-Raf1 (全長) : EcoRI-XhoI サイト

Raf-N (1-327 アミノ酸残基) : EcoRI-EcoRV サイト

Raf-C (316-648 アミノ酸残基) : EcoRV-XhoI サイト

MEKK-N (1-640 アミノ酸残基) : BamHI-EcoRI サイト

TAK1 (全長) : EcoRI-XhoI サイト

TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) [Science, 270, 2008 (1995)] をコードするDNAは、マウス細胞株 BAF-B03c DNAライブラリーより常法により取得した。

【0224】

3) GSTとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製

c-Junの1~79アミノ酸残基をコードするDNAをGST融合タンパク質発現ベクターpGEX-3X (Pharmacia社製) のBamHI-EcoRI サイトに挿入し、GST-c-Jun (1-79) 発現ベクターを作製した。

【0225】

該発現ベクターを用い、常法によりE. coliを形質転換し、GST-c-Jun (1-79) を発現させた。

発現されたGST-c-Jun (1-79) をGlutathione sepharose 4B (Pharmacia社製) を用いて精製した。

【0226】

JNK3 (全長) をコードする NcoI (平滑化) - BamHI (平滑化) DNA断片を、GST融合タンパク質発現ベクター-pGEX-2T (Pharmacia社製) の BamHI (平滑化) サイトに挿入し、GST-JNK3発現ベクターを作製した。

【0227】

該発現ベクターを用い、常法により E. coli を形質転換し、GST-JNK3を発現させた。発現させたGST-JNK3をGlutathione sepharose 4B(Pharmacia 社製)を用いて精製した。

4) Sタグペプチドとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製

下記ポリペプチドをコードするDNAまたは該DNAの断片を、発現ベクター-S-modified pcDNA3のSタグ配列の下流に存在する下記制限酵素サイトに挿入し、S-JSAP1a、S-JSAP1a Δ 1、S-JSAP1a Δ 2、S-JSAP1a Δ 3、S-JSAP1a Δ 4、S-JSAP1a Δ 5、S-JSAP1b、S-JSAP1c、S-JSAP1d、S-JSAP3、S-JSAP4、S-JSAP4 (1-754)、S-JSAP4 (755-1508)、S-JSAP4 (755-1062)、S-JSAP4 (1063-1331)、S-JSAP4 (1332-1508) を発現するベクターを各々作製した。

【0228】

挿入した各DNAのコードするポリペプチドおよび各挿入制限酵素サイトは以下の通りである。

JSAP1a (全長) : NotI サイト

JSAP1a Δ 1 (1-1053アミノ酸残基) : NotI-XhoI

JSAP1a Δ 2 (744-1305アミノ酸残基) : NotI サイト

JSAP1a Δ 3 (1054-1305アミノ酸残基) : BamHI サイト

JSAP1a Δ 4 (343-1053アミノ酸残基) : HindIII-XhoI

JSAP1a Δ 5 (1-343アミノ酸残基) : HindIII サイト

JSAP1b (全長) : NotI サイト

JSAP1c (全長) : NotI サイト

J S A P 1 d (全長) : NotI サイト

J S A P 3 (全長) : EcoRI-XhoI/SalI

J S A P 4 (全長) : EcoRI-HindIII

J S A P 4 (1-754 アミノ酸残基) : EcoRI-HindIII

J S A P 4 (755-1508 アミノ酸残基) : EcoRI-HindIII

J S A P 4 (755-1062 アミノ酸残基) : EcoRI-HindIII

J S A P 4 (1063-1331 アミノ酸残基) : EcoRI-HindIII

J S A P 4 (1332-1508 アミノ酸残基) : EcoRI-HindIII。

【0229】

また J S A P 5 の c D N A (部分長) を発現ベクター p G A D 1 0 (Clontech 社製) の G A L 4 A D 配列の下流に存在する E c o R I サイトに組み込んだ (図 1、図 2、図 3)。

5) J N K 3 を発現するベクターの調製

p G E M - 3 Z f (+) (Promega 社製) を E c o R I で切断後、G C C A T G C の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドリンカーを添加して self-ligation を行い、p G E M - 3 Z f (+) に N c o I サイトを付加したプラスミド p G E M - N C O を作製した。

【0230】

該 p G E M - N C O の N c o I - B a m H I サイトに J N K 3 (全長) を挿入し、発現ベクター (pGEM-JNK3) を調製した。

6) 恒常的に活性化された C d c 4 2 を発現するベクターの調製

恒常的に活性化されている C d c 4 2 を、点変異導入により C d c 4 2 の 1 2 番目のグリシンをバリンに変換することにより作製した [C d c 4 2 (G 1 2 V)]。該 C d c 4 2 (G 1 2 V) (全長) をコードする DNA 断片 (B a m H I - 平滑末端) を発現ベクター s-modified pcDNA3 の S タグ配列の下流に存在する B a m H I - E c o R V サイトに組み込んだ。

【0231】

7) 恒常的に活性化された M E K K 1 を発現するベクターの調製

Δ M E K K 1 (1169-1488 アミノ酸残基。M E K K 1 の truncated fo

rm、恒常的に活性化されている)をコードするcDNAをpEF-BOS vector [Nucleic Acids Res., 18, 5322 (1990)]のXbaIサイトへ組み込んだ。

【0232】

8) 5XGAL4-LUCレポーター、GAL4-c-Jun、GAL4-E1k1発現ベクター

5XGAL4-LUCレポーター、GAL4-c-JunおよびGAL4-E1k1発現ベクターはいずれもStratagene社から購入し、用いた。

【0233】

9) RL(Renilla luciferase)コントロールベクター

RLコントロールベクターはPromega社から購入し、用いた。

10) Mycタグペプチドとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製

J SAP4 (全長) およびJ SAP4 (1063-1331アミノ酸残基) をコードするcDNAをそれぞれ、発現ベクターMyc-modified pcDNA3のMycタグ配列の下流に存在するEcoRI-NotIに組み込み、Myc-J SAP4 (全長) およびMyc-J SAP4 (1063-1331) を発現するベクターを各々作製した。

【0234】

11) His-Sタグペプチドとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製
下記ポリペプチドをコードするDNAを、His-Sタグをコードする発現ベクターHis-S-modified pcDNA3のHis-Sタグ配列の下流に存在する下記制限酵素サイトに挿入し、MAPK-His-S、MAPKKK-His-S、JNK1-His-S、JNK2-His-S、JNK3-His-S、ERK2-His-S、MEKK1-His-Sを発現するベクターを各々作製した。

【0235】

全長ポリペプチドをコードする各DNAの挿入制限酵素サイトは以下の通りである。

JNK1 [NotI(平滑化)-BamHI DNA断片] : EcoRV-BamHI

JNK2 [NotI(平滑化)-BamHI DNA断片] : EcoRV-BamHI

JNK3 [NotI(平滑化)-BamHI(平滑化) DNA断片] : EcoRV

ERK2 [BamHI DNA断片] : BamHI

MEKK1 [HindIII DNA断片] : HindIII

【0236】

実施例2 JSAP1a、JSAP1b、JSAP1c、JSAP1d

以下に記載の解析結果は、JSAP1a、JSAP1b、JSAP1c、JSAP1dいずれも同一であったため、図には代表してJSAP1aの結果を示した。以下、JSAP1a、JSAP1b、JSAP1cおよびJSAP1dを総称してJSAP1と記載した。

【0237】

1) ノーザンハイブリダイゼーションによるJNK3、JSAP1 mRNAの発現解析

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4972 (1995)に記載されている方法に準じてノーザンハイブリダイゼーションを実施した。

【0238】

即ち、³²Pで放射ラベルしたJNK3、JSAP1、 β -actin cDNAプローブを用いてマウスの肝臓、脾臓、腎臓、脳、心臓、肺、精巣の各組織について解析した。

結果を図4に示す。

【0239】

JNK3は脳特異的に発現が見られた。JSAP1aについては、約6-kbの大きさのJSAP1a mRNAが脳特異的に見られた。

2) 種々のMAPKに対するJSAP1の結合特異性と結合領域の解析

実施例1(2)で調製した、S-JSAP1a、S-JSAP1b、S-JSAP1cまたはS-JSAP1d(全長)発現ベクター、およびFlag-JNK1、Flag-JNK2、Flag-JNK3、Flag-ERK2またはFlag-p38発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1(Mirus社製)を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

【0240】

培養 3 4 時間後、該細胞を緩衝液 B 中で溶解し、S プロテインアガロース (Novagen 社製) を添加し、S - J S A P 1 および S - J S A P 1 と結合するポリペプチドを沈降させ回収した。

得られた回収画分を SDS - P A G E で展開し、メンブレン Immobilon-P (Millipore 社製) にトランスファーした。

【 0 2 4 1 】

該メンブレンおよびプローブとして anti-Flag M5 monoclonal 抗体 (Kodak 社製) を用いウエスタンブロッティングを行い、該抗体と結合するポリペプチド (F 1 a g - J N K 3) を E C L 検出システム (Amersham 社製) で可視化し、J S A P 1 と結合可能な M A P K を調べた。

【 0 2 4 2 】

結果を図 5 に示す。J S A P 1 は J N K 3 とのみ結合し、他の M A P K とは結合しないことがわかった。

J N K 3 との J S A P 1 結合領域を以下の方法で解析した。

実施例 1 (2) で調製した発現ベクターを用い、T r x · S と J S A P 1 の部分断片との融合ポリペプチド T r x · S - J S A P 1 (断片) を常法に従って、E. coli で発現させ、S プロテインアガロースに結合させ取得した。

【 0 2 4 3 】

実施例 1 (2) で調製した発現ベクター pGEM-JNK3 を用い、全長 J N K 3 の ³⁵S 放射能ラベル体を、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega 社製) により in vitro 翻訳により調製した。

得られた J N K 3 の ³⁵S 放射能ラベル体と、T r x · S - J S A P 1 (断片) を緩衝液 A [5 0 m M T r i s - H C l (p H 7. 5)、1 5 0 m M N a C l、0. 5 % N P - 4 0] 中で混合し、4 °C で 2 時間、チューブを回転させながら反応液を攪拌し反応させた。

【 0 2 4 4 】

反応後、緩衝液 A で 3 回洗浄し、得られた沈降物を SDS - P A G E で展開し、オートラジオグラフィ (autoradiography) により解析した。

その結果、J N K 3 との J S A P 1 の結合領域は、1 1 5 ~ 2 7 4 (J S A P

1 a)、115~283 (JSAP1 b)、115~306 (JSAP1 c)、115~305 (JSAP1 d) 番目のアミノ酸残基領域に存在することがわかった。

【0245】

JSAP1 aでの結果を図6に示した。JSAP1 aでは結合領域は115~274番目のアミノ酸残基であった。

3) JNK3によるJSAP1のリン酸化と、該リン酸化によるJNK3の結合能の欠失

JNK3とのJSAP1の結合領域には、下記のようにproline-directed serine/threonine kinaseによるリン酸化を受ける可能性のあるスレオニン残基が存在する。

【0246】

JSAP1 a: 234、244、255番目のアミノ酸残基

JSAP1 b: 243、253、264番目のアミノ酸残基

JSAP1 c: 266、276、287番目のアミノ酸残基

JSAP1 d: 265、275、286番目のアミノ酸残基

上記リン酸化を受けると推定される箇所を含むJSAP断片とTrx・Sとの融合ポリペプチド、Trx・S-JSAP1 a (115-274アミノ酸残基)、Trx・S-JSAP1 b (115-283アミノ酸残基)、Trx・S-JSAP1 c (115-306アミノ酸残基)、Trx・S-JSAP1 d (115-305アミノ酸残基)を実施例1(2)に従って調製した。

【0247】

実施例1(2)で取得したFlag-JNK3発現ベクターおよびΔMEKK1発現ベクターを、あるいはFlag-JNK3発現ベクターのみをCOS-7細胞にTransIT-LT1 (Mirus社製)を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

【0248】

34時間培養後、該細胞を緩衝液B中で溶解し、プロテインGアガロース (pr

otein-G-agarose) に固定化した anti-Flag M5 モノクローナル抗体 (Kodak 社製) を用いて Flag-JNK3 を免疫沈降させた。

得られた JNK3 あるいは活性化された JNK3 と、S プロテインアガロースに結合させた、上記で調製した Trx · S-JSAP1a (115-274 アミノ酸残基)、Trx · S-JSAP1b (115-283 アミノ酸残基)、Trx · S-JSAP1c (115-306 アミノ酸残基) または Trx · S-JSAP1d (115-305 アミノ酸残基) を用い、Cell, 76, 1025 (1994) に記載されている方法に準じて、 ^{32}P で放射ラベルされた ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) を加えリン酸化反応を行った。リン酸化のポジティブコントロールとして、GST-c-Jun (1-79 アミノ酸残基) を基質として用いた [EMBO. J., 15, 2760 (1996)]。

【0249】

該反応液を SDS-PAGE で展開後、オートラジオグラフィーにより解析した。

結果を図 7 に示す。JSAP1 は効率的にリン酸化された (図 7 のレーン 4)。ポジティブコントロールである c-Jun のリン酸化も確認された (図 7 のレーン 2)。

【0250】

JSAP1 においてリン酸化を受けている可能性のある上記に示したスレオニン残基を、それぞれアラニン残基へ、オーバーラッピング PCR 法 [overlapping PCR; Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1989)] による部位特異的変異により変換し、変換させた該ポリペプチドを実施例 1 (2) の方法に準じて発現させ、取得した。

【0251】

取得したポリペプチド WT~T-3 は以下の通りである。

(i) Trx · S-JSAP1a (115-274 アミノ酸残基領域)

WT : アラニン残基への置換なし

T-0 : 234、244、255 番目をアラニン残基に置換

T-1 : 244、255 番目をアラニン残基に置換

T-2: 234、255 番目をアラニン残基に置換

T-3: 234、244 番目をアラニン残基に置換

(ii) Trx · S-JSAP1b (115-283 アミノ酸残基領域)

WT : アラニン残基への置換なし

T-0: 243、253、264 番目をアラニン残基に置換

T-1: 253、264 番目をアラニン残基に置換

T-2: 243、264 番目をアラニン残基に置換

T-3: 243、253 番目をアラニン残基に置換

(iii) Trx · S-JSAP1c (115-306 アミノ酸残基領域)

WT : アラニン残基への置換なし

T-0: 266、276、287 番目をアラニン残基に置換

T-1: 276、287 番目をアラニン残基に置換

T-2: 266、287 番目をアラニン残基に置換

T-3: 266、276 番目をアラニン残基に置換

(iv) Trx · S-JSAP1d (115-305 アミノ酸残基領域)

WT : アラニン残基への置換なし

T-0: 265、275、286 番目をアラニン残基に置換

T-1: 275、286 番目をアラニン残基に置換

T-2: 265、286 番目をアラニン残基に置換

T-3: 265、275 番目をアラニン残基に置換

上記取得したポリペプチドを用いてリン酸化を行った。

【0252】

Trx · S-JSAP1a における結果を図 7 に示す。

Trx · S-JSAP1a ~ d いずれも、リン酸化の予想されるスレオニンを全てアラニンに置換した T-0 のみリン酸化が認められず (図 7 のレーン 5)、WT および他のアラニン置換体 (T-1 ~ 3) は全てリン酸化された (図 7 のレーン 6 ~ 8)。

【0253】

上記でリン酸化を受けなかった上記 T-0、Flag-JNK3、ΔMEKK

1を、実施例2(1)の方法に準じて、同時にレチノイン酸によって分化させたP19細胞で発現させ、anti-Flag M5 monoclonal抗体(Kodak社製)で細胞を染色した。

【0254】

同様の実験を、上記でリン酸化を受けることの示されたWT、Flag-JNK3、 Δ MEKK1を用いて行い、細胞を染色した。

J SAP1aでの結果を図8に示す。

J SAP1いずれにおいても、T-Oを用いた場合には、JNK3は細胞質にのみ存在し、核内に移行できなかったが、WTを用いた場合にはJNK3は核内に移行していた。

【0255】

上記結果は、JNK3によりJ SAP1がリン酸化されることにより、それまでJ SAP1に結合していたJNK3がJ SAP1より解離し、核内へと移行することを示している。

4) 種々のMAPKK、MAPKKKとJ SAP1との結合

実施例1(2)で取得したS-J SAP1(全長)発現ベクター、MAPKKであるSEK1(MKK4)のFlag融合ポリペプチドFlag-SEK1の発現ベクターおよび Δ MEKK1発現ベクターの3種類のベクター、あるいはS-J SAP1(全長)発現ベクターおよびFlag-SEK1発現ベクターの2種類のベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1(Mirus社製)を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

【0256】

34時間培養後、細胞を緩衝液B中で溶解させ、S-protein agarose(Novagen社製)を用い、S-J SAP1およびS-J SAP1と結合するポリペプチドを免疫沈降させた。

【0257】

得られた回収画分をSDS-PAGEで展開し、メンブレンImmobilon-P(Millipore社製)にトランスファーし、anti-Flag M5 monoclonal抗体(Kodak社製)

をプローブとして、Flag-SEK1をECL検出システム（Amersham社製）で可視化した。

結果を図9に示す。ΔMEKK1によってSEK1が活性化された場合に、JSAP1との結合が見られた（図9のレーン2および3）。ΔMEKK1によるSEK1の活性化は、リン酸化され活性化されたSEK1を認識するモノクローナル抗体（NEB社製）を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。

【0258】

上記で得られた結果を基に、JSAP1中の、SEK1結合領域について、上記と同様の方法で解析した。即ち、S-JSAP1の種々の欠失変異体を作製し、それぞれとFlag-SEK1との結合を調べた。

JSAP1a由来の欠失変異体を用いて得られた結果を図9のレーン4～8に示す。JSAP1aの全長FL（1-1305残基）、欠失変異体Δ2（744-1305残基を有する）および欠失変異体Δ3（1054-1305残基を有する）にSEK1は結合することができたが（図9のレーン5、7、8）、欠失変異体Δ1（1-1053残基を有する）には結合することができなかった（図9レーン6）。

【0259】

以上のことから、JSAP1aのC末端側の1054～1305アミノ酸残基にSEK1が結合することがわかった。

他のMAPKKのJSAP1aへの結合についても同様の方法で解析した。

結果を図10および図11に示す。

【0260】

MKK7（JNK経路の他のMAPKK）もSEK1と同様にJSAP1aのC末端の1054-1305残基に結合した（図10）。ERKまたはp38経路のMAPKKであるMEK1、MKK6もJSAP1aに結合した（図11）。

【0261】

実施例1（2）で取得したS-JSAP1a（全長）FL、欠失変異体Δ1（1-1053アミノ酸残基を有する）、またはΔ4（343-1053アミノ酸

残基を有する)の発現ベクター、およびMAPKKKであるMEKK1のN末端部分配列ポリペプチド(MEKK1-N; 1-640アミノ酸残基)とFlagタグとの融合ポリペプチドFlag-MEKK-Nの発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1 (Mirus社製)を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

【0262】

上記において、全長のMEKK1のCOS-7細胞での発現は非常に低かったため、本実験においてはMEKK1の部分配列であるMEKK1-Nを用いた。

結果を図12に示す。MEKK-NはJSAP1aのFL、 $\Delta 1$ 、 $\Delta 4$ いずれとも結合した。 $\Delta 4$ に結合したことより、MEKK-NはJSAP1aの343-1053アミノ酸残基部に結合すると考えられた。

【0263】

同様の実験を、MEKK1のN末端部以外の部分を有するポリペプチドを用いて行い、該ポリペプチドが上記N末端部以外の領域でJSAP1aと結合しないことを確認した。

MEKK1は、全長JSAP1aよりもJSAP1a $\Delta 1$ (1-1053アミノ酸残基)に、より高親和性で結合している(図12のレーン3)ことより、上記でSEK1の結合部位と考えられたJSAP1aのC末端の1054-1305残基は、MEKK1の結合を阻害する作用のある可能性がある。

【0264】

さらに、MAPK経路のうち、ERK経路に関与しているMAPKKKである、c-Raf1とJSAP1との結合について調べた。

実施例1(2)で取得したc-Raf1のN末端側領域(1-327アミノ酸残基)またはC末端側領域(316-648アミノ酸残基)をFlagペプチドと融合させたFlag-Raf-NまたはFlag-Raf-Cを発現するベクターおよび実施例1(2)で取得したS-JSAP1各々の発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1 (Mirus社製)を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発

現させた。

【0265】

上記において、全長の c-R a f 1 の C O S-7 細胞での発現は非常に低かったため、本実験においては c-R a f 1 の部分配列である R a f-N および R a f-C を用いた。

結果を図 13 に示す。R a f-C は J S A P 1 (図 13 のレーン 4) と結合したが、R a f-N は結合しなかった (図 13 のレーン 2)。また、R a f-C の結合親和性は M E K K 1 の親和性より低かった (図 13 のレーン 4、6)。

【0266】

以上から J N K 3 経路に關与する、M A P K K K (M E K K 1)、M A P K (S E K 1、M K K 7)、M A P K (J N K 3) の J S A P 1 の結合領域は互いに異なることがわかった。

J S A P 1 a において、M E K K 1 に対する結合領域は 343-1053 アミノ酸残基領域、S E K 1、M K K 7 に対する結合領域は 1054-1305 残基領域、J N K 3 に対する結合領域は 115-274 残基領域であった。

【0267】

J S A P 1 はロイシンジッパー構造を有していると考えられた。ロイシンジッパー構造を形成しているロイシン残基の各 J S A P 1 中のアミノ酸配列番号を以下に示す。

J S A P 1 a : 392、399、406、413、420、427

J S A P 1 b : 401、408、415、422、429、436

J S A P 1 c : 424、431、438、445、452、459

J S A P 1 d : 423、430、437、444、451、458

以上のことから、J S A P 1 はホモ、あるいはヘテロダイマーとして存在し、機能していると考えられた。

【0268】

5) レポーター系を用いた J S A P 1 の J N K 3 経路におけるスキャフォールドタンパク質としての機能解析

全長 J S A P 1 の過剰発現による J N K 3 経路の活性化に関して解析した。

J S A P 1 a および J N K 3 をもともと発現している、レチノイン酸によって分化させた P 1 9 細胞に、5 X G A L 4 - L U C レポーター発現ベクター (Stratagene社製)、G A L 4 - c - J u n 発現ベクター (c - J u n 活性化ドメインを含む 1 - 2 2 3 残基、Stratagene社製) および R L コントロールベクター (Promega社製) を導入した。

【0269】

該 P 1 9 細胞に、全長 S - J S A P 1 a - F L 発現ベクター、S - J S A P 1 a - Δ 5 (1 - 3 4 3 残基) 発現ベクターおよび/または恒常的に活性化されている S - C d c 4 2 (G 1 2 V) 発現ベクターを導入した。

該 P 1 9 細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

【0270】

培養 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、G A L 4 - c - J u n 転写活性、即ち、J N K 3 活性を求めた。ルシフェラーゼ活性の相対値は、R L ルシフェラーゼの活性値で補正して求めた。

結果を図 14 に示す。

【0271】

C d c 4 2 (G 1 2 V) は J N K 3 活性を上昇させ、また J S A P 1 a の過剰発現は C d c 4 2 (G 1 2 V) と同程度に J N K 3 活性を上昇させた。

C d c 4 2 (G 1 2 V) と全長 J S A P 1 a を同時に発現させた細胞では、それぞれ単独の場合と相加的に J N K 3 活性を上昇させた。

【0272】

これに対し、J N K 3 結合領域を含む J S A P 1 a - Δ 5 (1 - 3 4 3 アミノ酸残基) と C d c 4 2 (G 1 2 V) を同時に発現させた場合は、J N K 3 活性は阻害された。

上記と同様の方法で、全長 J S A P 1 の過剰発現による E R K 経路への影響を調べた。

【0273】

レチノイン酸によって分化させた P 1 9 細胞に、5 X G A L 4 - L U C レポ-

ター発現ベクター、GAL4-E1k1 (E1k1活性化ドメインを含む307-427残基) 発現ベクターおよびRLコントロールベクターを導入した。

該P19細胞に、S-JSAP1a-FL (全長JSAP1a) 発現ベクターおよび/または恒常的に活性化されているΔRaf1 [Mol. Cell. Biol., 9, 639 (1989)] のFlagポリペプチド (Flag-ΔRaf1) 発現ベクターを導入した。

【0274】

該P19細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養24時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、GAL4-E1k1転写活性、即ち、ERK活性を求めた。ルシフェラーゼ活性の相対値は、RLルシフェラーゼの活性値で補正して求めた。

【0275】

結果を図15に示す。

JSAP1aの過剰発現は、ERK活性を阻害することが明らかとなった。

JSAP1はJNK3経路に存在するMAKPKKK、MAPKKおよびJNK3のすべてと結合し、また上記結果より、JNK3経路の効果的、かつ特異的な活性化を担う重要なスキヤフォールドポリペプチドとして機能していると結論された。

【0276】

6) JNK3によるJSAP1のリン酸化を阻害する阻害剤をスクリーニングする系の構築

JNK3のリン酸化基質として用いる、JSAP1aのアミノ酸配列114-274に相当する部分タンパク質 (JNK3結合部位、および3つのリン酸化されるThr残基を含む) とGSTとの融合タンパク質を以下のように調製した。

【0277】

JSAP1a特異的なPCRプライマーとして、配列番号15で示される塩基配列を有するフォワードプライマーおよび配列番号16で示される塩基配列を有するリバースプライマーを合成した。

フォワードプライマーは、配列番号 1 で示される塩基配列を有する J S A P 1 a をコードする c D N A の塩基配列 4 4 6 ~ 4 6 4 の領域に相当する塩基配列の直前に E c o R V 認識配列を導入した塩基配列を有する。

【0278】

リバースプライマーは、配列番号 1 で示される塩基配列を有する J S A P 1 a をコードする c D N A の塩基配列 9 0 9 ~ 9 2 8 の領域の相補配列に相当する塩基配列の直後にストップコドンを導入し、更にその直後に E c o R I 認識配列を導入した塩基配列を有する。

【0279】

これら 2 種類のプライマーを用い、実施例 1 の (2) で調製した全長 J S A P 1 a を含む発現プラスミド p E T 3 2 a をテンプレートとして K O D DNA polymerase (Toyobo 社製) により P C R 反応を Thermal cycler 450 (宝社製) により行なった。

【0280】

増幅した J S A P 1 a c D N A 断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、該断片を Qiaex II DNA Extraction Kit (Qiagen 社製) により抽出した。

同様に、制限酵素 E c o R I と E c o R V で切断した pBluescript II K S⁻ の D N A 断片を抽出した。

【0281】

得られた直鎖状の pBluescript II K S⁻ の D N A 断片と J S A P 1 a D N A 断片を、DNA ligation Kit (宝社製) を用い、16℃ で ligation 反応を行なうことにより、連結し、pBluescript II K S⁻ に J S A P 1 a D N A 断片を挿入したプラスミド p R H 1 0 0 1 を取得した。

【0282】

該 p R H 1 0 0 1 で E. coli のコンピテント細胞をトランスホーム後、該 E. coli をアンピシリンを添加した L B 培地プレート (トリプトン 1 %、酵母エキス 0.5 %、N a C l 1 %) で一晚培養した。

現れたコロニーより得られた E. coli を 2 m l のアンピシリンを添加した T B 培地 [トリプトン 12 g、酵母エキス 24 g、グリセロール 4 m l に 900

mlの水を加え、オートクレーブ滅菌し、60℃に冷却後、滅菌した100mlリン酸カリウム溶液(0.17M KH_2PO_4 、0.72M K_2HPO_4)を添加した培地]中で培養し、該E. coliよりpRH1001を抽出した。

【0283】

該pRH1001をEcoRIとEcoRVで切断し、得られたDNA断片の塩基配列を決定することにより、JSAP1aをコードする塩基配列と一致することを確認した。

EcoRIとEcoRVで切断したpRH1001のDNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、該断片をQiaex II DNA Extraction Kit(Qiagen社製)により抽出した。

【0284】

同様に、制限酵素EcoRIとSmaIで切断したpGEX-3X(Pharmacia社製)のDNA断片を抽出した。

得られた直鎖状のpGEX-3XのDNA断片とpRH1001のDNA断片を、DNA ligation Kit(宝社製)を用い、16℃でligation反応を行なうことにより、連結し、pBluescript II KS⁻にJSAP1a DNA断片を挿入したプラスミドpRH1003を取得した。

【0285】

該pRH1003でE. coliのコンピテント細胞をトランスホーム後、該E. coliをアンピシリンを添加したLB培地プレート上で一晚培養した。

現れたコロニーより得られたE. coliを2mlのアンピシリンを添加したTB培地中で培養し、該E. coliよりpRH1003を抽出した。

【0286】

pRH1003はGST-JSAP1融合タンパク質をコードするDNA断片を持つE. coli発現ベクターである。

上記pRH1003を有するE. coliを20mlのアンピシリンを添加したTB培地中、37℃で一晩前培養した。

【0287】

得られた培養液を、440mlのアンピシリンを添加したTB培地に添加し、

25℃で5時間培養後、該培養液にisopropyl-b-D-thiogalactopyranoside(IPTG)を添加し、25℃で15時間培養した。

得られた培養液より、遠心分離により菌体を回収した。該菌体に、0.1mg/ml リゾチームを添加したPBSを20ml添加し、4℃で1時間放置した。

【0288】

放置後、200μlの10% N-lauroylsarcosineを加え、超音波破碎機を用いて菌体を破壊した。

得られた菌体破壊液を100,000 x g、4℃の条件で1時間遠心分離し、細胞質画分を取得した。

【0289】

該細胞質画分より、以下の方法でGlutathione sepharose 4B(Pharmacia社製)を用いて、GST-JSAP1融合タンパク質精製した。

即ち、Glutathione sepharose 4B担体のゲル5mlをカラム詰め、0.1% N-lauroylsarcosineを添加したPBSで平衡化した。該平衡化したGlutathione sepharose 4B担体にGST-JSAP1融合タンパク質を吸着し、30mlのN-lauroylsarcosineを添加したPBSで洗浄後、20mlの溶出緩衝液(5mM還元型glutathioneおよび0.1% N-lauroylsarcosineを添加したPBS)でGST-JSAP1融合タンパク質を溶出した。該溶出液をPBSに対して透析し、精製されたGST-JSAP1融合タンパク質溶液を取得した。

【0290】

該精製GST-JSAP1融合タンパク質溶液は-80℃で保存することが可能で、使用時に解凍して用いた。

ΔMEKK1、JNK3および活性化JNK3を以下のように調製、取得した。

COS-7細胞を60mmプレートに2~5 x 10⁵ cells/ml DMEM培地となるようにまき、37℃で一晩培養した。

【0291】

9μlのFuGene 6 transfection reagent(F.Hoffmann-La Roche社製)を30

0 μ l のOPTI-MEM(Gibco BRL, Life Technologies社製)に加え、得られた溶液に、実施例1の(2)で調製した Δ MEKK1をコードするcDNAを導入した発現ベクター0.1~0.5 μ gおよび/またはJNK3をコードするcDNAを導入した発現ベクター4.5~4.9 μ gを添加し、15分間室温で放置した。

【0292】

得られた混合液を、上記培養COS-7細胞に3滴ずつ加えゆっくりと混ぜた後、該細胞を37℃で30~40時間培養した。

該細胞をスクレイパーで回収し、10mlのPBSで洗浄した。

得られたCOS-7細胞に1mlの細胞溶解緩衝液[50mM HEPES / NaOH(pH7.6)、150mM NaCl、0.3% (V/V) Nonidet P-40、20mM MgCl₂、1mM ethyleneglycol bis(β -aminoether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA)、20mM β -glycerophosphate、10mM Na₃VO₄、10mM NaF、40 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 μ g/ml pepstatin A、1 μ g/ml leupeptin、1 μ g/ml chymostatin、2mM dithiothreitol(DTT)]を加え、細胞を破壊した。

【0293】

得られた細胞破壊液を、20,000 x g、4℃の条件で遠心分離し、上清を取得した。 Δ MEKK1をコードするcDNAを導入した発現ベクター導入由来の細胞破壊液の上清を Δ MEKK1酵素溶液として、JNK3をコードするcDNAを導入した発現ベクター導入由来の細胞破壊液の上清をJNK3酵素溶液として、 Δ MEKK1、JNK3をコードするcDNAを導入した2種類の発現ベクター導入由来の細胞破壊液の上清を活性化JNK3酵素溶液として用いた。

【0294】

以下に、活性化JNK3によるJSAP1のリン酸化を阻害する阻害剤のスクリーニングする系について記述する。

活性化JNK3によるJSAP1のリン酸化は、活性化JNK3、[γ -³³P]-ATP(74 TBq/mmol, New England Nuclear社製)、およびGST-JSAP

1 を用いた均質な液相系で反応後、GST-JSAP1 への³³P の取り込み放射活性を指標にして測定した。

【0295】

96 ウェルプレート (Corning 社製) の各ウェルに、スクリーニング用反応液 [3 μM [γ-³³P]-ATP (28 kBq/ml)、2.3 μM GST-JSAP1、20 mM MgCl₂、20 mM β-glycerophosphate、20 mM p-nitrophenylphosphate、1 mM Na₃VO₄、1 mM NaF、2 mM DTT、1% DMSO または 1% DMSO を含む被検化合物、2% (V/V) 上記で調製した 3 種類の酵素溶液のいずれか (実際のスクリーニング時には活性化 JNK3 酵素溶液を用いる)、50 mM HEPES/NaOH (pH 7.6)] を 100 μl ずつ加え、30℃ で 10~30 分間放置した。

【0296】

放置後、100 μl のエタノールを該反応液に添加して反応を停止し、GST-JSAP1 を沈殿させた。

該沈殿をフィルターメイトハーベスター (Packard 社製) で、ユニフィルタープレート GF/B (Packard 社製) 上でろ過し、吸着させた。

【0297】

該プレートを PBS で 3 回以上洗浄し、乾燥後、シンチレーターである Microscint-20 (Packard 社製) 40 μl を添加し、検出器 TopCount-HTS (Packard 社製) により放射活性を測定した。

結果を第 1 表に示した。

【0298】

【表 1】

第 1 表 COS-7 溶解液による GST-JSAP1 のリン酸化

| 酵素溶液* ¹ | リン酸化活性(pmol/mg/min) |
|--------------------|---------------------|
| — | 23 |
| ΔMEKK1 | 26 |
| JNK3 | 37 |
| 活性化 JNK3 | 978 |

*¹ : スクリーニング用反応液の調製時に用いた酵素溶液

GST-JSAP1 は、上記系において、スクリーニング用反応液に活性化 JNK3 酵素溶液を用いた時のみ特異的にリン酸化された。

【0299】

従って、スクリーニング用反応液に活性化 JNK3 酵素溶液を用いた上記系は、JNK3 による JSAP1 のリン酸化を阻害する阻害剤を効率的にスクリーニングすることのできる系として利用可能である。真のリン酸化活性は活性化 JNK3 酵素溶液を用いない系におけるリン酸化活性を差し引くことにより求めることができる。

【0300】

上記活性化 JNK3 酵素溶液が活性化 JNK3 を含有する溶液であることを以下の実験で確認した。

上記で調製した ΔMEKK1 酵素溶液、JNK3 酵素溶液および活性化 JNK3 酵素溶液それぞれ各 10 μg (酵素量として) を用いて SDS-PAGE を行い、泳動された各タンパク質をメンブレン Hybond-ECL (Amersham-Pharmacia Biotech 社製) にトランスファーした。

【0301】

該メンブレン、およびプローブとして anti-active JNK polyclonal 抗体 (Promega 社製) および anti-Flag M2 monoclonal 抗体 (Sigma 社製) を用い、ウェスタンブロットングを行なった。発色は検出緩衝液 [100 mM Tris/HCl (pH 9.5)、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.33 mg/ml nitro

blue tetrazolium (NBT)、0.17 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP)、p-toluidine salt] を用いて行なった。結果を図 16 に示した。

【0302】

活性化 JNK3 酵素溶液のみにリン酸化された活性化 JNK3 のバンドが観測された (図 16-A のレーン 2)。JNK3 酵素溶液には JNK3 タンパク質のバンドが観測され (図 16-B のレーン 3)、JNK3 のリン酸化によるバンドシフト (図 16-B のレーン 2 および 3) が観測された。

【0303】

上記で構築されたスクリーニング系における、リン酸化反応の基質 ATP および GST-JSAP1 の K_m 値を、酵素反応速度論入門 生物化学実験法 21 大西正健著 学会出版センター 1987 記載の方法に準じて算出した。

ATP、GST-JSAP1 とともに Michaelis-Menten 型の基質-反応初速度曲線を示し、Lineweaver-Burk plot より、ATP、GST-JSAP1 の K_m 値はそれぞれ、 $6.3 \mu\text{M}$ 、 $0.48 \mu\text{M}$ であることがわかった。

【0304】

実施例 3 JSAP3 の JNK3 への結合

実施例 1 (2) で取得した S-JSAP3 (全長) 発現ベクターおよび Flag-JNK3 発現ベクターを COS-7 細胞に TransIT-LT1 (Mirus 社製) を用いてトランスフェクションした後、該 COS-7 細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

【0305】

培養 34 時間後、該細胞を緩衝液 B 中で溶解し、S プロテインアガロースを添加し、S-JSAP3 および S-JSAP3 と結合するポリペプチドを沈降させた。

得られた回収画分を SDS-PAGE で展開し、メンブレン Immobilon-P (Millipore 社製) にトランスファーした。

【0306】

該メンブレンおよびプローブとして anti-Flag M5 monoclonal 抗体 (Kodak 社製

を用いウエスタンブロッティングを行い、該抗体と結合するポリペプチド (F1 a g-JNK3) を ECL 検出システム (Amersham 社製) で可視化した。

結果を図 17 に示す。

【0307】

J SAP 3 は JNK 3 結合することが確認された (図 17 のレーン 2)。

以下の方法で、J SAP 3 の転写因子 ATF 2 との結合および ATF 2 結合領域の解析を行った。

実施例 1 (2) に記載の方法に準じて、J SAP 3 (全長ポリペプチド)、Trx · S、Trx · S-ATF 2 (アミノ酸残基 1-107) および Trx · S-ATF 2 (アミノ酸残基 1-116) 融合ポリペプチドを *E. coli* で発現させ、S プロテインアガロースに結合させることによりそれぞれ取得した。

【0308】

実施例 1 (2) で取得した S-J SAP 3 (全長) 発現ベクターを使用して、S-J SAP 3 の ³⁵S 放射能ラベル体を、TNT T7 Quick Coupled Transcription / Translation System (Promega 社製) により *in vitro* 翻訳により調製した。

【0309】

得られた J SAP 3 の ³⁵S 放射能ラベル体と、Trx · S、Trx · S-ATF 2 (アミノ酸残基 1-107)、Trx · S-ATF 2 (アミノ酸残基 1-116) それぞれを緩衝液 A 中で混合し、4℃で2時間、チューブを回転させながら反応液を攪拌し、反応させた。

【0310】

反応後、緩衝液 A で 3 回洗浄し、得られた沈降物を SDS-PAGE で展開し、オートラジオグラフィー (autoradiography) により解析した。

結果を図 18 に示した。

J SAP 3 は ATF 2 の 108-116 アミノ酸残基の領域に結合することがわかった。

【0311】

J SAP 3 の ATF 2 結合領域 108-116 残基のうち、108-112 の配列は、すでに報告されている CtBP 結合配列 motif PLDL S と完全に一致

した [J. Biol. Chem., 273, 8549 (1998)]。

【0312】

実施例 4 JSAP4

1) JSAP4 の JNK3 への結合

実施例 1 (2) で取得した S-JSAP4 (全長) 発現ベクターおよび Flag-JNK3 発現ベクターを COS-7 細胞に TransIT-LT1 (Mirus 社製) を用いてトランスフェクションした後、該 COS-7 細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

【0313】

培養 34 時間後、該細胞を緩衝液 B 中で溶解し、S プロテインアガロースを添加し、S-JSAP4 および S-JSAP4 と結合するポリペプチドを沈降させた。

得られた回収画分を SDS-PAGE で展開し、メンブレン Immobilon-P (Millipore 社製) にトランスファーした。

【0314】

該メンブレンおよびプローブとして anti-Flag M5 monoclonal 抗体 (Kodak 社製) を用いウエスタンブロッティングを行い、該抗体と結合するポリペプチド (Flag-JNK3) を ECL 検出システム (Amersham 社製) で可視化した。

結果を図 17 に示す。

【0315】

JSAP4 は JNK3 結合することが確認された (図 17 のレーン 4)。JSAP4 の JNK3 結合領域を以下の方法で解析した。

実施例 1 (2) で取得した GST あるいは GST-JNK3 融合タンパク質発現ベクターを *E. coli* 中で発現させ、該タンパク質を Glutathione-agarose (Sigma 社製) に吸着させた。

【0316】

実施例 1 (2) で取得した全長、あるいは部分長の JSAP4 の S-JSAP4 発現ベクターを使用して、種々の S-JSAP4 の ³⁵S 放射能ラベル体を、TN T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega 社製) により

in vitro翻訳により調製し、SDS-PAGEで展開し、オートラジオグラフィー (autoradiography) により解析した。

【0317】

結果を図19に示した。

緩衝液Aを含むチューブに、得られた種々のJSAP4の³⁵S放射能ラベル体、およびGlutathione-agaroseに吸着させたGSTあるいはGST-JNK3融合タンパク質添加し、チューブを回転させながら混合し、4℃で2時間放置した。

放置後、緩衝液Aで3回洗浄し、Glutathione-agaroseに吸着しているタンパク質をSDS-PAGEで展開し、オートラジオグラフィーにより解析した。

【0318】

結果を図20に示した。

JSAP4の1063-1331アミノ酸残基領域にJNK3が結合することが判明した。

2) JSAP4のJNK1、JNK2への結合

実施例1(2)で取得したMycタグを付加したMyc-JSAP4(1063-1331アミノ酸残基領域。JNK3と結合する領域)発現ベクターおよび、His-Sタグを付加したHis-S-JNK1、His-S-JNK2、His-S-JNK3またはHis-S-ERK2発現ベクターを、COS-7細胞にFuGene 6 transfection reagent(F.Hoffmann-La Roche社製)を用いてコトランスフェクションした。

【0319】

該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養34時間後、該細胞を緩衝液B中で溶解し、S-protein agarose (Novagen社製)を用い、免疫沈降させた。

【0320】

得られた沈降画分をSDS-PAGEで展開し、メンブレンImmobilon-P (Millipore社製)にトランスファーした。

該メンブレンおよびプローブとしてanti-Myc monoclonal抗体 9E10 (Boehringer Mannheim社製)を用いウエスタンブローディングを行い、該抗体と結合するMyc-JSAP4をECL検出システム (Amersham社製) で可視化した。またそれぞれのコトランスフェクションされた細胞中のMyc-JSAP4の発現は、細胞溶解後、anti-Myc monoclonal抗体 9E10 (Boehringer Mannheim 社製) によるウエスタンブローディングにより、またHis-S-JNK1、His-S-JNK2、His-S-JNK3およびHis-S-ERK2の発現はanti-His polyclonal抗体 (Santa Cruz社製) によるウエスタンブローディングにより確認した。

【0321】

その結果を図21に示した。

JSAP4はJNK1、JNK2、JNK3と結合するが、ERK2とは結合しないことが判明した。

3) ノーザンハイブリダイゼーションによるJSAP4 mRNAの発現解析

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4972 (1995)に記載されている方法に準じてノーザンハイブリダイゼーションを実施した。

【0322】

即ち、 ^{32}P で放射ラベルした、JSAP4、 β -actin cDNAプローブを用いてマウスの精巣、大腸、心臓、肺、腎臓、脳、脾臓、肝臓の各組織について解析した。

結果を図22に示す。

【0323】

JSAP4は精巣、心臓、腎臓でわずかな発現が認められたが、特に脳に最も多い発現が見られた。

JSAP4にはWD40-repeatと呼ばれる配列が見られるため、他のタンパク質との相互作用 (結合) に関与し得ることが予想され、JNK3経路において、その情報伝達で重要な機能を有していることが予想された [FEBS Lett., 307, 131 (1994)]。

【0324】

4) レポーター系を用いた JSAP4 の JNK 経路における機能解析

全長 JSAP4 を過剰発現させ JNK 経路への影響を以下の方法で解析した。

COS-7 細胞に、5XGAL4-LUC レポーター発現ベクター (Stratagene 社製)、GAL4-c-Jun 発現ベクター (c-Jun 活性化ドメインを含む 1-223 残基、Stratagene 社製) および RL コントロールベクター (Promega 社製) を FuGENE6 transfection reagent (F. Hoffmann-La Roche 社製) を用いて導入した。

【0325】

該 COS-7 細胞に、実施例 1 の (2) で作製した Myc-JSAP4-FL 発現ベクター、His-S-MEKK1 発現ベクターおよび Flag-TAK1 発現ベクターのいずれか一つ以上を FuGENE6 transfection reagent を用いて導入した。

【0326】

該 COS-7 細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養 34 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、GAL4-c-Jun 転写活性、即ち、JNK 活性を求めた。ルシフェラーゼ活性の相対値は、RL ルシフェラーゼの活性値で補正して求めた。

【0327】

結果を図 23 に示す。

JSAP4 そのものだけでは、JNK 活性の上昇はわずかであったが、MAPKKK である MEKK1、TAK1 は JNK 活性をそれぞれ 3 倍、3.2 倍に上昇させた。しかし、MEKK1 および TAK1 による JNK 活性化は、JSAP4 の過剰発現によってそれぞれさらに 2.7 倍、3 倍に増強された。

【0328】

上記と同様の方法で、全長 JSAP4 の過剰発現による ERK 経路への影響を調べた。

COS-7 細胞に、5XGAL4-LUC レポーター発現ベクター、GAL4-E1k1 (E1k1 活性化ドメインを含む 307-427 残基) 発現ベクター

および R L コントロールベクターを FuGENE6 transfection reagent を用いて導入した。

【0329】

該 COS-7 細胞に、実施例 1 の (2) で作製した Myc-JSAP4-FL 発現ベクター、および／または恒常的に活性化されている Δ Raf1 [Mol. Cell Biol., 9, 639 (1989)] の Flag ポリペプチド (Flag- Δ Raf1) 発現ベクターを FuGENE6 transfection reagent を用いて導入した。

【0330】

該 COS-7 細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養 34 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、GAL4-E1k1 転写活性、即ち、ERK 活性を求めた。ルシフェラーゼ活性の相対値は、RL ルシフェラーゼの活性値で補正して求めた。

【0331】

結果を図 24 に示す。

JSAP4 の過剰発現は、ERK 経路の活性に対して影響しなかった。また活性化型 Δ Raf-1 による ERK 活性化に対しても影響しなかった。

実施例 4 の 1)、2) の結果より、JSAP4 は JNK1、JNK2、JNK3 に結合し、かつそれら JNK 経路の活性化の効率を特異的により増強するという機能を有していると結論された。

【0332】

実施例 5 JSAP5 の JNK3 への結合

実施例 1 (2) で取得した S-JSAP5 (部分長) 発現ベクターおよび Flag-JNK3 発現ベクターを COS-7 細胞に TransIT-LT1 (Mirus 社製) を用いてトランスフェクションした後、該 COS-7 細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

【0333】

培養 34 時間後、該細胞を緩衝液 B 中で溶解し、S プロテインアガロースを添加し、S-JSAP5 および S-JSAP5 と結合するポリペプチドを沈降させ

た。

得られた回収画分を SDS-PAGE で展開し、メンブレン Immobilon-P (Millipore 社製) にトランスファーした。

【0334】

該メンブレンおよびプローブとして anti-Flag M5 monoclonal 抗体 (Kodak 社製) を用いウエスタンブローディングを行い、該抗体と結合するポリペプチド (Flag-JNK3) を ECL 検出システム (Amersham 社製) で可視化した。

結果を図 17 に示す。

J SAP5 は JNK3 結合することが確認された (図 17 のレーン 6)。

【0335】

【発明の効果】

本発明により得られる JNK3 結合活性を有する新規ポリペプチドの DNA を用いることにより、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防、治療が可能となる。

【0336】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 15 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 16 - 人工配列の説明: 合成 DNA

【0337】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,

<120> NOVEL POLYPEPTIDE

<130> H11-1324N2

<140>

<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 3 3 8 】

<210> 1

<211> 4173

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (107)..(4021)

<400> 1

ggcctgggcg gcggcacatc ctaaggtagc ggctgcctga ggtgacagct gcccgtggat 60

tcgggccccg gaacgagccg cgctggcggc ggCggcggtg gccgcg atg atg gag 115

Met Met Glu

1

atc cag atg gac gag gga gga ggt gtg gtg gtg tac caa gac gac tac 163

Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln Asp Asp Tyr

5

10

15

tgc tcg ggc tcg gtc atg tcg gag cgt gtg tcg ggc ctg gcg ggc tcc 211

Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu Ala Gly Ser

20

25

30

35

atc tac cgc gag ttc gag cgc ctc att cac tgc tat gac gag gag gtg 259

Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp Glu Glu Val

40

45

50

gtc aag gag ctc atg ccg ctg gtg gtg aac gtg ctg gag aac ctt gac 307

Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu Asn Leu Asp

55

60

65

tcg gtg ctg agc gag aac cag gag cac gag gtg gag ctg gag ctc cta 355

Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu Glu Leu Leu

70

75

80

cgc gag gac aac gag cag ctg ctc acg caa tac gag cgc gag aag gcg 403

Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala

85

90

95

ctg cgc aaa cag gcc gag gag aaa ttc atc gaa ttt gaa gat gcc ttg 451

Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu Asp Ala Leu

100

105

110

115

gaa caa gag aag aaa gaa ctc cag atc cag gta gaa cat tat gag ttt 499

Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His Tyr Glu Phe

120

125

130

cag aca cgc cag ctg gag cta aag gcc aaa aac tat gca gat cag att 547

Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Ile

135

140

145

tcc cga ctg gag gaa cga gaa tcg gag atg aag aag gaa tac aat gcc 595

Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu Tyr Asn Ala

150

155

160

ctg cac cag cgg cac aca gag atg atc cag acc tat gtg gaa cac att 643

Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val Glu His Ile

165

170

175

gaa aga tcc aag atg cag caa gtt ggg ggt agc ggc caa aca gaa agc 691

Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln Thr Glu Ser

180

185

190

195

agc ctg ccc ggg cgg agg aag gag cgt ccc acc tct ctg aat gtc ttc 739

Ser Leu Pro Gly Arg Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu Asn Val Phe

200

205

210

ccc ctg gct gat ggc atg tgt cca aac gat gag atg tct gag tca ggc 787

Pro Leu Ala Asp Gly Met Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu Ser Gly

215

220

225

cag tcc tca gca gct gca aca ccc agt acc aca ggt acc aag tcc aac 835

Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys Ser Asn

230

235

240

aca ccc acg tcc tcc gtg ccc tca gca gca gtc acg cca ctc aac gag 883

Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Glu

245

250

255

agc cta cag ccc ctg ggg gac tat gtc agt gtc aca aag aac aac aag 931

Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn Asn Lys

260

265

270

275

cag gcc cga gag aag cgc aat agc cgt aac atg gag gtc cag gtc acc 979

Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val Gln Val Thr

280

285

290

caa gag atg cgg aac gtc agt atc ggc atg ggc agc agt gac gag tgg 1027

Gln Glu Met Arg Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser Asp Glu Trp

295

300

305

tcc gat gtt cag gac att atc gac tcc acc cca gag ctg gat gtg tgt 1075

Ser Asp Val Gln Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu Asp Val Cys

310

315

320

cct gaa acc cgt ctg gag cgc aca gga agc agc cca acc cag gga att 1123

Pro Glu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr Gln Gly Ile

325

330

335

gta aac aaa gct ttt gga atc aac act gac tcc ttg tat cac gaa ctc 1171

Val Asn Lys Ala Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr His Glu Leu

340 345 350 355

tcc acg gcg gga tct gag gtc atc ggg gat gtg gac gag gga gct gat 1219

Ser Thr Ala Gly Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu Gly Ala Asp

360 365 370

ctc cta ggg gag ttt tca gtg cgc gat gat ttt ttt gga atg ggc aaa 1267

Leu Leu Gly Glu Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly Met Gly Lys

375 380 385

gaa gtg ggg aac ctg ctg ctg gag aac tca cag ctt cta gag aca aaa 1315

Glu Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu Glu Thr Lys

390 395 400

aat gct tta aat gta gtg aag aat gac ctc att gct aag gtt gac caa 1363

Asn Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val Asp Gln

405 410 415

ctg tca gga gaa cag gag gtc ctg aag ggt gag ctg gaa gca gcc aag 1411

Leu Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys

420 425 430 435

caa gcg aaa gtc aag ctg gag aac cga atc aaa gag ctt gaa gaa gaa 1459

Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu

440 445 450

ctg aag aga gtc aag tca gag gca gta act gcc cgc cgt gag ccc aga 1507

Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg

455

460

465

gaa gag gtg gag gat gta agc agc tat ctc tgt aca gaa ttg gac aaa 1555
Glu Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys
470 475 480

atc ccc atg gcc cag cgc cga cgc ttc aca cgg gtg gag atg gcc cga 1603
Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg
485 490 495

gtg ctc atg gaa cgc aac cag tac aag gaa cgc ctc atg gag ctg cag 1651
Val Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln
500 505 510 515

gag gct gtg agg tgg act gaa atg atc aga gca tca agg gaa cac cca 1699
Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro
520 525 530

tct gtc cag gag aag aag aag tcc acc atc tgg cag ttc ttt agt cgc 1747
Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe Phe Ser Arg
535 540 545

ctc ttc agc tcc tca tct agc ccc cct ccg gcc aaa cga tcc tac cca 1795
Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg Ser Tyr Pro
550 555 560

tct gtg aac att cac tac aag tca ccc act gca gct ggc ttt agc cag 1843
Ser Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly Phe Ser Gln
565 570 575

cgt cgc agc cat gct ttg tgc cag atc tca gcc ggc agc agg ccc ctg 1891
 Arg Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg Pro Leu
 580 585 590 595

gag ttc ttc cct gat gat gac tgc acc tct tct gcc cgg cgg gag cag 1939
 Glu Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg Arg Glu Gln
 600 605 610

aag cgg gag cag tac cgc cag gtt cgt gaa cac gtg cgc aat gat gac 1987
 Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg Asn Asp Asp
 615 620 625

ggg agg ctg cag gcc tgt ggg tgg agc ctg cct gcc aag tac aag cag 2035
 Gly Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr Lys Gln
 630 635 640

ctg agc ccc aat gga ggc cag gaa gac acc cgg atg aaa aat gtg cct 2083
 Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn Val Pro
 645 650 655

gtc cct gtg tac tgt cgc cct ctg gtg gag aag gac cct tcg aca aag 2131
 Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser Thr Lys
 660 665 670 675

ctg tgg tgt gct gct ggt gtc aac ctg agt ggg tgg aag cca cat gaa 2179
 Leu Trp Cys Ala Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro His Glu
 680 685 690

gag gac tct agc aat gga ccc aag cct gta cca ggt cga gac cct ctg 2227
Glu Asp Ser Ser Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp Pro Leu

695

700

705

acc tgt gac cgg gaa gga gaa ggc gaa ccc aag agc aca cac cca tca 2275
Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr His Pro Ser

710

715

720

cct gag aag aag aag gca aag gaa acc cct gag gca gat gct acc tcc 2323
Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala Thr Ser

725

730

735

agt cgg gta tgg atc ctc acc agc acc ctg aca acc agc aag gtg gtg 2371
Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys Val Val

740

745

750

755

atc att gat gcc aac cag cca ggc aca att gtg gat cag ttc aca gtc 2419
Ile Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe Thr Val

760

765

770

tgc aat gcc cac gtc ctg tgt atc tcc agc att cct gcg gcc agt gac 2467
Cys Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala Ser Asp

775

780

785

agt gac tat ccc cct ggg gag atg ttc cta gac agt gat gtg aac cct 2515
Ser Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp Val Asn Pro

790

795

800

gaa gat tca ggt gct gat ggt gtg ctg gct ggc atc acc ctg gtg ggg 2563

Glu Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu Val Gly

805

810

815

tgt gct acc cgc tgc aat gtt cca cgt agc aac tgt tcc tca cga gga 2611

Cys Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser Arg Gly

820

825

830

835

gac acc cca gta ctg gac aag ggg cag ggg gat gtg gcg acc act gcc 2659

Asp Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr Thr Ala

840

845

850

aat ggg aag gtc aac ccg tcc caa tcc aca gaa gaa gcc aca gaa gcc 2707

Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr Glu Ala

855

860

865

aca gag gtg cca gac cct ggt ccc agc gag tca gaa gca acg aca gtc 2755

Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr Thr Val

870

875

880

cgg ccc ggg cct ctc aca gag cat gtc ttt act gac cca gca ccc acc 2803

Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro Ala Pro Thr

885

890

895

cca tcc tcc agc acc cag cct gcc agt gag aat ggg tca gaa tcc aat 2851

Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu Ser Asn

900

905

910

915

ggc acc att gta cag cct cag gtg gag ccc agt ggg gaa ctc tca aca 2899

Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu Ser Thr

| | | | |
|---|------|------|------|
| 920 | 925 | 930 | |
| aca acc agt agc gct gca ccc act atg tgg cta gga gcc cag aat ggc | | | 2947 |
| Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly | | | |
| 935 | 940 | 945 | |
| tgg ctc tat gtg cat tca gcg gta gcc aac tgg aag aag tgt ctg cac | | | 2995 |
| Trp Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys Leu His | | | |
| 950 | 955 | 960 | |
| tcc atc aag cta aaa gac tct gtg ctg agc ctg gtg cat gtc aaa ggc | | | 3043 |
| Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His Val Lys Gly | | | |
| 965 | 970 | 975 | |
| cga gtg ctg gta gct ctt gca gat ggg acc ctg gct atc ttc cat cgt | | | 3091 |
| Arg Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg | | | |
| 980 | 985 | 990 | 995 |
| gga gag gat ggc cag tgg gac ctg agc aac tac cac cta atg gac ctg | | | 3139 |
| Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Met Asp Leu | | | |
| 1000 | 1005 | 1010 | |
| ggc cac cca cac cac tcc atc cgc tgc atg gct gtt gtg aat gac cga | | | 3187 |
| Gly His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val Asn Asp Arg | | | |
| 1015 | 1020 | 1025 | |
| gtt tgg tgt ggc tac aag aac aag gtg cat gtt atc cag ccc aag aca | | | 3235 |
| Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln Pro Lys Thr | | | |
| 1030 | 1035 | 1040 | |

atg cag att gag aaa tca ttt gat gcc cac cca agg cgg gaa agc cag 3283

Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg Glu Ser Gln

1045

1050

1055

gta cgt cag ctg gcc tgg atc ggt gat gga gtg tgg gtc tct att cgc 3331

Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val Ser Ile Arg

1060

1065

1070

1075

ttg gat tct acc ctt cgg ctc tac cat gct cac acc cac cag cac ctg 3379

Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His Gln His Leu

1080

1085

1090

cag gat gtg gac att gag ccc tat gtt agc aag atg cta gga acc ggc 3427

Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly Thr Gly

1095

1100

1105

aag ctg ggc ttc tcc ttc gtg cgc atc aca gcc tta ctc att gca ggc 3475

Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile Ala Gly

1110

1115

1120

aac cgt ctg tgg gtg ggc act ggc aat ggg gtt gtc atc tcc atc ccc 3523

Asn Arg Leu Trp Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile Ser Ile Pro

1125

1130

1135

ttg act gag act gtg gtc ctg cat cga ggc cag ctc cta ggg ctc cga 3571

Leu Thr Glu Thr Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu Gly Leu Arg

1140

1145

1150

1155

gcc aac aag aca tcc cca aca tct ggg gag ggg acc cgc cca ggg ggc 3619

Ala Asn Lys Thr Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg Pro Gly Gly

1160

1165

1170

atc atc cat gtg tat ggg gac gac agc agt gac aag gcc gcc agt agt 3667

Ile Ile His Val Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala Ala Ser Ser

1175

1180

1185

ttc atc ccc tac tgc tcc atg gca cag gct cag ctt tgc ttc cat ggg 3715

Phe Ile Pro Tyr Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys Phe His Gly

1190

1195

1200

cac cgt gat gct gtc aaa ttc ttt gtc tct gtg cca gga aat gtg ctg 3763

His Arg Asp Ala Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu

1205

1210

1215

gcc act ctc aat ggc agt gtg cta gac agc cca tca gag ggc cct ggg 3811

Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly Pro Gly

1220

1225

1230

1235

cct gct gca ccc gct gca gat gct gag ggc cag aag ttg aag aat gca 3859

Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys Asn Ala

1240

1245

1250

ctg gtg ctg agt ggt ggt gaa ggt tac att gac ttc cgt atc gga gac 3907

Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile Gly Asp

1255

1260

1265

gga gag gat gat gaa act gag gaa tgt gcc ggg gac gtg aac cag aca 3955

Gly Glu Asp Asp Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn Gln Thr

1270

1275

1280

aag ccc tcg ttg tcc aag gct gag cgc agc cac atc atc gtg tgg cag 4003

Lys Pro Ser Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile Val Trp Gln

1285

1290

1295

gtg tcc tac acc cct gag tgagaccctg tcctacctga tgccaactgt 4051

Val Ser Tyr Thr Pro Glu

1300

1305

acataggacc ctacctgcct gcctccccgc ctgttcctg gggcagccag gttcgtccat 4111

ccccitttaa cctctcaact tgcagctttt gcctgaggtc cagcccctag ctgttagaga 4171

gg

4173

【0 3 3 9】

<210> 2

<211> 4200

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (107)..(4045)

<400> 2

ggcctgggcg gcggcacatc ctaaggtagc ggctgcctga ggtgacagct gcccgtggat 60

tcgggccccg gaacgagccg cgctggcggc ggcgcggtta gccgcg atg atg gag 115

Met Met Glu

1

atc cag atg gac gag gga gga ggt gtg gtg gtg tac caa gac gac tac 163

Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln Asp Asp Tyr

5

10

15

tgc tcg ggc tcg gtc atg tcg gag cgt gtg tcg ggc ctg gcg ggc tcc 211

Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu Ala Gly Ser

20

25

30

35

atc tac cgc gag ttc gag cgc ctc att cac tgc tat gac gag gag gtg 259

Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp Glu Glu Val

40

45

50

gtc aag gag ctc atg ccg ctg gtg gtg aac gtg ctg gag aac ctt gac 307

Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu Asn Leu Asp

55

60

65

tcg gtg ctg agc gag aac cag gag cac gag gtg gag ctg gag ctc cta 355

Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu Glu Leu Leu

70

75

80

cgc gag gac aac gag cag ctg ctc acg caa tac gag cgc gag aag gcg 403

Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala

85

90

95

ctg cgc aaa cag gcc gag gag aaa ttc atc gaa ttt gaa gat gcc ttg 451
 Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu Asp Ala Leu
 100 105 110 115

gaa caa gag aag aaa gaa ctc cag atc cag gta gaa cat tat gag ttt 499
 Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His Tyr Glu Phe
 120 125 130

cag aca cgc cag ctg gag cta aag gcc aaa aac tat gca gat cag att 547
 Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Ile
 135 140 145

tcc cga ctg gag gaa cga gaa tcg gag atg aag aag gaa tac aat gcc 595
 Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu Tyr Asn Ala
 150 155 160

ctg cac cag cgg cac aca gag atg atc cag acc tat gtg gaa cac att 643
 Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val Glu His Ile
 165 170 175

gaa aga tcc aag atg cag caa gtt ggg ggt agc ggc caa aca gaa agc 691
 Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln Thr Glu Ser
 180 185 190 195

agc ctg ccc ggg cgg agt cct cgc cag tcg tgg agg aaa agc agg aag 739
 Ser Leu Pro Gly Arg Ser Pro Arg Gln Ser Trp Arg Lys Ser Arg Lys
 200 205 210

gag cgt ccc acc tct ctg aat gtc ttc ccc ctg gct gat ggc atg tgt 787

Glu Arg Pro Thr Ser Leu Asn Val Phe Pro Leu Ala Asp Gly Met Cys

215

220

225

cca aac gat gag atg tct gag tca ggc cag tcc tca gca gct gca aca 835

Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu Ser Gly Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr

230

235

240

ccc agt acc aca ggt acc aag tcc aac aca ccc acg tcc tcc gtg ccc 883

Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys Ser Asn Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro

245

250

255

tca gca gca gtc acg cca ctc aac gag agc cta cag ccc ctg ggg gac 931

Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Glu Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp

260

265

270

275

tat gtc agt gtc aca aag aac aac aag cag gcc cga gag aag cgc aat 979

Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn Asn Lys Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn

280

285

290

agc cgt aac atg gag gtc cag gtc acc caa gag atg cgg aac gtc agt 1027

Ser Arg Asn Met Glu Val Gln Val Thr Gln Glu Met Arg Asn Val Ser

295

300

305

atc ggc atg ggc agc agt gac gag tgg tcc gat gtt cag gac att atc 1075

Ile Gly Met Gly Ser Ser Asp Glu Trp Ser Asp Val Gln Asp Ile Ile

310

315

320

gac tcc acc cca gag ctg gat gtg tgt cct gaa acc cgt ctg gag cgc 1123

Asp Ser Thr Pro Glu Leu Asp Val Cys Pro Glu Thr Arg Leu Glu Arg

325

330

335

aca gga agc agc cca acc cag gga att gta aac aaa gct ttt gga atc 1171

Thr Gly Ser Ser Pro Thr Gln Gly Ile Val Asn Lys Ala Phe Gly Ile

340

345

350

355

aac act gac tcc ttg tat cac gaa ctc tcc acg gcg gga tct gag gtc 1219

Asn Thr Asp Ser Leu Tyr His Glu Leu Ser Thr Ala Gly Ser Glu Val

360

365

370

atc ggg gat gtg gac gag gga gct gat ctc cta ggg gag ttt tca gtg 1267

Ile Gly Asp Val Asp Glu Gly Ala Asp Leu Leu Gly Glu Phe Ser Val

375

380

385

cgc gat gat ttt ttt gga atg ggc aaa gaa gtg ggg aac ctg ctg ctg 1315

Arg Asp Asp Phe Phe Gly Met Gly Lys Glu Val Gly Asn Leu Leu Leu

390

395

400

gag aac tca cag ctt cta gag aca aaa aat gct tta aat gta gtg aag 1363

Glu Asn Ser Gln Leu Leu Glu Thr Lys Asn Ala Leu Asn Val Val Lys

405

410

415

aat gac ctc att gct aag gtt gac caa ctg tca gga gaa cag gag gtc 1411

Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val Asp Gln Leu Ser Gly Glu Gln Glu Val

420

425

430

435

ctg aag ggt gag ctg gaa gca gcc aag caa gcg aaa gtc aag ctg gag 1459

Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 440 | 445 | 450 | |
| aac cga atc aaa gag ctt gaa gaa gaa ctg aag aga gtc aag tca gag | | | 1507 |
| Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu | | | |
| 455 | 460 | 465 | |
| gca gta act gcc cgc cgt gag ccc aga gaa gag gtg gag gat gta agc | | | 1555 |
| Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg Glu Glu Val Glu Asp Val Ser | | | |
| 470 | 475 | 480 | |
| agc tat ctc tgt aca gaa ttg gac aaa atc ccc atg gcc cag cgc cga | | | 1603 |
| Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| cgc ttc aca cgg gtg gag atg gcc cga gtg ctc atg gaa cgc aac cag | | | 1651 |
| Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg Val Leu Met Glu Arg Asn Gln | | | |
| 500 | 505 | 510 | 515 |
| tac aag gaa cgc ctc atg gag ctg cag gag gct gtg agg tgg act gaa | | | 1699 |
| Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu | | | |
| 520 | 525 | 530 | |
| atg atc aga gca tca agg gaa cac cca tct gtc cag gag aag aag aag | | | 1747 |
| Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys | | | |
| 535 | 540 | 545 | |
| tcc acc atc tgg cag ttc ttt agt cgc ctc ttc agc tcc tca tct agc | | | 1795 |
| Ser Thr Ile Trp Gln Phe Phe Ser Arg Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser | | | |
| 550 | 555 | 560 | |

ccc cct ccg gcc aaa cga tcc tac cca tct gtg aac att cac tac aag 1843

Pro Pro Pro Ala Lys Arg Ser Tyr Pro Ser Val Asn Ile His Tyr Lys

565

570

575

tca ccc act gca gct ggc ttt agc cag cgt cgc agc cat gct ttg tgc 1891

Ser Pro Thr Ala Ala Gly Phe Ser Gln Arg Arg Ser His Ala Leu Cys

580

585

590

595

cag atc tca gcc ggc agc agg ccc ctg gag ttc ttc cct gat gat gac 1939

Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg Pro Leu Glu Phe Phe Pro Asp Asp Asp

600

605

610

tgc acc tct tct gcc cgg cgg gag cag aag cgg gag cag tac cgc cag 1987

Cys Thr Ser Ser Ala Arg Arg Glu Gln Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln

615

620

625

gtt cgt gaa cac gtg cgc aat gat gac ggg agg ctg cag gcc tgt ggg 2035

Val Arg Glu His Val Arg Asn Asp Asp Gly Arg Leu Gln Ala Cys Gly

630

635

640

tgg agc ctg cct gcc aag tac aag cag ctg agc ccc aat gga ggc cag 2083

Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr Lys Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln

645

650

655

gaa gac acc cgg atg aaa aat gtg cct gtc cct gtg tac tgt cgc cct 2131

Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn Val Pro Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro

660

665

670

675

ctg gtg gag aag gac cct tcg aca aag ctg tgg tgt gct gct ggt gtc 2179
Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser Thr Lys Leu Trp Cys Ala Ala Gly Val

680 685 690

aac ctg agt ggg tgg aag cca cat gaa gag gac tct agc aat gga ccc 2227
Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro His Glu Glu Asp Ser Ser Asn Gly Pro

695 700 705

aag cct gta cca ggt cga gac cct ctg acc tgt gac cgg gaa gga gaa 2275
Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp Pro Leu Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu

710 715 720

ggc gaa ccc aag agc aca cac cca tca cct gag aag aag aag gca aag 2323
Gly Glu Pro Lys Ser Thr His Pro Ser Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys

725 730 735

gaa acc cct gag gca gat gct acc tcc agt cgg gta tgg atc ctc acc 2371
Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala Thr Ser Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr

740 745 750 755

agc acc ctg aca acc agc aag gtg gtg atc att gat gcc aac cag cca 2419
Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys Val Val Ile Ile Asp Ala Asn Gln Pro

760 765 770

ggc aca att gtg gat cag ttc aca gtc tgc aat gcc cac gtc ctg tgt 2467
Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe Thr Val Cys Asn Ala His Val Leu Cys

775 780 785

atc tcc agc att cct gcg gcc agt gac agt gac tat ccc cct ggg gag 2515

Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala Ser Asp Ser Asp Tyr Pro Pro Gly Glu
790 795 800

atg ttc cta gac agt gat gtg aac cct gaa gat tca ggt gct gat ggt 2563
Met Phe Leu Asp Ser Asp Val Asn Pro Glu Asp Ser Gly Ala Asp Gly
805 810 815

gtg ctg gct ggc atc acc ctg gtg ggg tgt gct acc cgc tgc aat gtt 2611
Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu Val Gly Cys Ala Thr Arg Cys Asn Val
820 825 830 835

cca cgt agc aac tgt tcc tca cga gga gac acc cca gta ctg gac aag 2659
Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser Arg Gly Asp Thr Pro Val Leu Asp Lys
840 845 850

ggg cag ggg gat gtg gcg acc act gcc aat ggg aag gtc aac ccg tcc 2707
Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr Thr Ala Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser
855 860 865

caa tcc aca gaa gaa gcc aca gaa gcc aca gag gtg cca gac cct ggt 2755
Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr Glu Ala Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly
870 875 880

ccc agc gag tca gaa gca acg aca gtc cgg ccc ggg cct ctc aca gag 2803
Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr Thr Val Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu
885 890 895

cat gtc ttt act gac cca gca ccc acc cca tcc tcc agc acc cag cct 2851
His Val Phe Thr Asp Pro Ala Pro Thr Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro

| | | | |
|--|------|------|-----|
| 900 | 905 | 910 | 915 |
| gcc agt gag aat ggg tca gaa tcc aat ggc acc att gta cag cct cag 2899 | | | |
| Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu Ser Asn Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln | | | |
| 920 | 925 | 930 | |
| gtg gag ccc agt ggg gaa ctc tca aca aca acc agt agc gct gca ccc 2947 | | | |
| Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro | | | |
| 935 | 940 | 945 | |
| act atg tgg cta gga gcc cag aat ggc tgg ctc tat gtg cat tca gcg 2995 | | | |
| Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly Trp Leu Tyr Val His Ser Ala | | | |
| 950 | 955 | 960 | |
| gta gcc aac tgg aag aag tgt ctg cac tcc atc aag cta aaa gac tct 3043 | | | |
| Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys Leu His Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser | | | |
| 965 | 970 | 975 | |
| gtg ctg agc ctg gtg cat gtc aaa ggc cga gtg ctg gta gct ctt gca 3091 | | | |
| Val Leu Ser Leu Val His Val Lys Gly Arg Val Leu Val Ala Leu Ala | | | |
| 980 | 985 | 990 | 995 |
| gat ggg acc ctg gct atc ttc cat cgt gga gag gat ggc cag tgg gac 3139 | | | |
| Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp | | | |
| 1000 | 1005 | 1010 | |
| ctg agc aac tac cac cta atg gac ctg ggc cac cca cac cac tcc atc 3187 | | | |
| Leu Ser Asn Tyr His Leu Met Asp Leu Gly His Pro His His Ser Ile | | | |
| 1015 | 1020 | 1025 | |

cgc tgc atg gct gtt gtg aat gac cga gtt tgg tgt ggc tac aag aac 3235

Arg Cys Met Ala Val Val Asn Asp Arg Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn

1030

1035

1040

aag gtg cat gtt atc cag ccc aag aca atg cag att gag aaa tca ttt 3283

Lys Val His Val Ile Gln Pro Lys Thr Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe

1045

1050

1055

gat gcc cac cca agg cgg gaa agc cag gta cgt cag ctg gcc tgg atc 3331

Asp Ala His Pro Arg Arg Glu Ser Gln Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile

1060

1065

1070

1075

ggt gat gga gtg tgg gtc tct att cgc ttg gat tct acc ctt cgg ctc 3379

Gly Asp Gly Val Trp Val Ser Ile Arg Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu

1080

1085

1090

tac cat gct cac acc cac cag cac ctg cag gat gtg gac att gag ccc 3427

Tyr His Ala His Thr His Gln His Leu Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro

1095

1100

1105

tat gtt agc aag atg cta gga acc ggc aag ctg ggc ttc tcc ttc gtg 3475

Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val

1110

1115

1120

cgc atc aca gcc tta ctc att gca ggc aac cgt ctg tgg gtg ggc act 3523

Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile Ala Gly Asn Arg Leu Trp Val Gly Thr

1125

1130

1135

ggc aat ggg gtt gtc atc tcc atc ccc ttg act gag act gtg gtc ctg 3571
Gly Asn Gly Val Val Ile Ser Ile Pro Leu Thr Glu Thr Val Val Leu
1140 1145 1150 1155

cat cga ggc cag ctc cta ggg ctc cga gcc aac aag aca tcc cca aca 3619
His Arg Gly Gln Leu Leu Gly Leu Arg Ala Asn Lys Thr Ser Pro Thr
1160 1165 1170

tct ggg gag ggg acc cgc cca ggg ggc atc atc cat gtg tat ggg gac 3667
Ser Gly Glu Gly Thr Arg Pro Gly Gly Ile Ile His Val Tyr Gly Asp
1175 1180 1185

gac agc agt gac aag gcc gcc agt agt ttc atc ccc tac tgc tcc atg 3715
Asp Ser Ser Asp Lys Ala Ala Ser Ser Phe Ile Pro Tyr Cys Ser Met
1190 1195 1200

gca cag gct cag ctt tgc ttc cat ggg cac cgt gat gct gtc aaa ttc 3763
Ala Gln Ala Gln Leu Cys Phe His Gly His Arg Asp Ala Val Lys Phe
1205 1210 1215

ttt gtc tct gtg cca gga aat gtg ctg gcc act ctc aat ggc agt gtg 3811
Phe Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val
1220 1225 1230 1235

cta gac agc cca tca gag ggc cct ggg cct gct gca ccc gct gca gat 3859
Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly Pro Gly Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp
1240 1245 1250

gct gag ggc cag aag ttg aag aat gca ctg gtg ctg agt ggt ggt gaa 3907

Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys Asn Ala Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu

1255

1260

1265

ggt tac att gac ttc cgt atc gga gac gga gag gat gat gaa act gag 3955

Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile Gly Asp Gly Glu Asp Asp Glu Thr Glu

1270

1275

1280

gaa tgt gcc ggg gac gtg aac cag aca aag ccc tcg ttg tcc aag gct 4003

Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn Gln Thr Lys Pro Ser Leu Ser Lys Ala

1285

1290

1295

gag cgc agc cac atc atc gtg tgg cag gtg tcc tac acc cct gag 4043

Glu Arg Ser His Ile Ile Val Trp Gln Val Ser Tyr Thr Pro Glu

1300

1305

1310

tgagaccctg tctacctga tgccaactgt acataggacc ctacctgcct gcctccccgc 4102

ctgttccctg gggcagccag gttcgtccat ccccttttaa cctctcaact tgcagctttt 4162

gcctgaggtc cagcccctag ctgttagaga gg 4200

【 0 3 4 0 】

<210> 3

<211> 4269

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (107)..(4117)

<400> 3

ggcctgggcg gcggcacatc ctaaggtagc ggctgcctga ggtgacagct gcccgtggat 60

tcgggccccg gaacgagccg cgctggcggc ggcggcgcta gccgcg atg atg gag 115

Met Met Glu

1

atc cag atg gac gag gga gga ggt gtg gtg gtg tac caa gac gac tac 163

Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln Asp Asp Tyr

5

10

15

tgc tcg ggc tcg gtc atg tcg gag cgt gtg tcg ggc ctg gcg ggc tcc 211

Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu Ala Gly Ser

20

25

30

35

atc tac cgc gag ttc gag cgc ctc att cac tgc tat gac gag gag gtg 259

Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp Glu Glu Val

40

45

50

gtc aag gag ctc atg ccg ctg gtg gtg aac gtg ctg gag aac ctt gac 307

Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu Asn Leu Asp

55

60

65

tcg gtg ctg agc gag aac cag gag cac gag gtg gag ctg gag ctc cta 355

Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu Glu Leu Leu

70

75

80

cgc gag gac aac gag cag ctg ctc acg caa tac gag cgc gag aag gcg 403

Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala

85

90

95

ctg cgc aaa cag gcc gag gag aaa ttc atc gaa ttt gaa gat gcc ttg 451

Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu Asp Ala Leu

100

105

110

115

gaa caa gag aag aaa gaa ctc cag atc cag gta gaa cat tat gag ttt 499

Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His Tyr Glu Phe

120

125

130

cag aca cgc cag ctg gag cta aag gcc aaa aac tat gca gat cag att 547

Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Ile

135

140

145

tcc cga ctg gag gaa cga gaa tcg gag atg aag aag gaa tac aat gcc 595

Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu Tyr Asn Ala

150

155

160

ctg cac cag cgg cac aca gag atg atc cag acc tat gtg gaa cac att 643

Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val Glu His Ile

165

170

175

gaa aga tcc aag atg cag caa gtt ggg ggt agc ggc caa aca gaa agc 691

Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln Thr Glu Ser

180

185

190

195

agc ctg ccc ggg cgg agc agg aag gag cgt ccc acc tct ctg aat gtc 739

Ser Leu Pro Gly Arg Ser Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu Asn Val

200

205

210

ttc ccc ctg gct gat ggc atg gta cgt gca cag atg ggg ggc aag ctc 787

Phe Pro Leu Ala Asp Gly Met Val Arg Ala Gln Met Gly Gly Lys Leu

215

220

225

gtg cct gcg ggg gac cac tgg cac ctg agt gac ctc ggc cag cta cag 835

Val Pro Ala Gly Asp His Trp His Leu Ser Asp Leu Gly Gln Leu Gln

230

235

240

tcc agc tcc agc tac cag tgt cca aac gat gag atg tct gag tca ggc 883

Ser Ser Ser Ser Tyr Gln Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu Ser Gly

245

250

255

cag tcc tca gca gct gca aca ccc agt acc aca ggt acc aag tcc aac 931

Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys Ser Asn

260

265

270

275

aca ccc acg tcc tcc gtg ccc tca gca gca gtc acg cca ctc aac gag 979

Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Glu

280

285

290

agc cta cag ccc ctg ggg gac tat gtc agt gtc aca aag aac aac aag 1027

Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn Asn Lys

295

300

305

cag gcc cga gag aag cgc aat agc cgt aac atg gag gtc cag gtc acc 1075

Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val Gln Val Thr

310

315

320

caa gag atg cgg aac gtc agt atc ggc atg ggc agc agt gac gag tgg 1123

Gln Glu Met Arg Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser Asp Glu Trp

325

330

335

tcc gat gtt cag gac att atc gac tcc acc cca gag ctg gat gtg tgt 1171

Ser Asp Val Gln Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu Asp Val Cys

340

345

350

355

cct gaa acc cgt ctg gag cgc aca gga agc agc cca acc cag gga att 1219

Pro Glu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr Gln Gly Ile

360

365

370

gta aac aaa gct ttt gga atc aac act gac tcc ttg tat cac gaa ctc 1267

Val Asn Lys Ala Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr His Glu Leu

375

380

385

tcc acg gcg gga tct gag gtc atc ggg gat gtg gac gag gga gct gat 1315

Ser Thr Ala Gly Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu Gly Ala Asp

390

395

400

ctc cta ggg gag ttt tca gtg cgc gat gat ttt ttt gga atg ggc aaa 1363

Leu Leu Gly Glu Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly Met Gly Lys

405

410

415

gaa gtg ggg aac ctg ctg ctg gag aac tca cag ctt cta gag aca aaa 1411

Glu Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu Glu Thr Lys

| | | | |
|--|-----|-----|-----|
| 420 | 425 | 430 | 435 |
| aat gct tta aat gta gtg aag aat gac ctc att gct aag gtt gac caa 1459 | | | |
| Asn Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val Asp Gln | | | |
| 440 | 445 | 450 | |
| ctg tca gga gaa cag gag gtc ctg aag ggt gag ctg gaa gca gcc aag 1507 | | | |
| Leu Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys | | | |
| 455 | 460 | 465 | |
| caa gcg aaa gtc aag ctg gag aac cga atc aaa gag ctt gaa gaa gaa 1555 | | | |
| Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu | | | |
| 470 | 475 | 480 | |
| ctg aag aga gtc aag tca gag gca gta act gcc cgc cgt gag ccc aga 1603 | | | |
| Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| gaa gag gtg gag gat gta agc agc tat ctc tgt aca gaa ttg gac aaa 1651 | | | |
| Glu Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys | | | |
| 500 | 505 | 510 | 515 |
| atc ccc atg gcc cag cgc cga cgc ttc aca cgg gtg gag atg gcc cga 1699 | | | |
| Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg | | | |
| 520 | 525 | 530 | |
| gtg ctc atg gaa cgc aac cag tac aag gaa cgc ctc atg gag ctg cag 1747 | | | |
| Val Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln | | | |
| 535 | 540 | 545 | |

gag gct gtg agg tgg act gaa atg atc aga gca tca agg gaa cac cca 1795

Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro

550

555

560

tct gtc cag gag aag aag aag tcc acc atc tgg cag ttc ttt agt cgc 1843

Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe Phe Ser Arg

565

570

575

ctc ttc agc tcc tca tct agc ccc cct ccg gcc aaa cga tcc tac cca 1891

Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg Ser Tyr Pro

580

585

590

595

tct gtg aac att cac tac aag tca ccc act gca gct ggc ttt agc cag 1939

Ser Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly Phe Ser Gln

600

605

610

cgt cgc agc cat gct ttg tgc cag atc tca gcc ggc agc agg ccc ctg 1987

Arg Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg Pro Leu

615

620

625

gag ttc ttc cct gat gat gac tgc acc tct tct gcc cgg cgg gag cag 2035

Glu Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg Arg Glu Gln

630

635

640

aag cgg gag cag tac cgc cag gtt cgt gaa cac gtg cgc aat gat gac 2083

Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg Asn Asp Asp

645

650

655

ggg agg ctg cag gcc tgt ggg tgg agc ctg cct gcc aag tac aag cag 2131
 Gly Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr Lys Gln
 660 665 670 675

ctg agc ccc aat gga ggc cag gaa gac acc cgg atg aaa aat gtg cct 2179
 Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn Val Pro
 680 685 690

gtc cct gtg tac tgt cgc cct ctg gtg gag aag gac cct tcg aca aag 2227
 Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser Thr Lys
 695 700 705

ctg tgg tgt gct gct ggt gtc aac ctg agt ggg tgg aag cca cat gaa 2275
 Leu Trp Cys Ala Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro His Glu
 710 715 720

gag gac tct agc aat gga ccc aag cct gta cca ggt cga gac cct ctg 2323
 Glu Asp Ser Ser Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp Pro Leu
 725 730 735

acc tgt gac cgg gaa gga gaa ggc gaa ccc aag agc aca cac cca tca 2371
 Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr His Pro Ser
 740 745 750 755

cct gag aag aag aag gca aag gaa acc cct gag gca gat gct acc tcc 2419
 Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala Thr Ser
 760 765 770

agt cgg gta tgg atc ctc acc agc acc ctg aca acc agc aag gtg gtg 2467

Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys Val Val

775

780

785

atc att gat gcc aac cag cca ggc aca att gtg gat cag ttc aca gtc 2515

Ile Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe Thr Val

790

795

800

tgc aat gcc cac gtc ctg tgt atc tcc agc att cct gcg gcc agt gac 2563

Cys Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala Ser Asp

805

810

815

agt gac tat ccc cct ggg gag atg ttc cta gac agt gat gtg aac cct 2611

Ser Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp Val Asn Pro

820

825

830

835

gaa gat tca ggt gct gat ggt gtg ctg gct ggc atc acc ctg gtg ggg 2659

Glu Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu Val Gly

840

845

850

tgt gct acc cgc tgc aat gtt cca cgt agc aac tgt tcc tca cga gga 2707

Cys Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser Arg Gly

855

860

865

gac acc cca gta ctg gac aag ggg cag ggg gat gtg gcg acc act gcc 2755

Asp Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr Thr Ala

870

875

880

aat ggg aag gtc aac ccg tcc caa tcc aca gaa gaa gcc aca gaa gcc 2803

Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr Glu Ala

| | | | |
|---|------|------|------|
| 885 | 890 | 895 | |
| aca gag gtg cca gac cct ggt ccc agc gag tca gaa gca acg aca gtc | | | 2851 |
| Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr Thr Val | | | |
| 900 | 905 | 910 | 915 |
| cgg ccc ggg cct ctc aca gag cat gtc ttt act gac cca gca ccc acc | | | 2899 |
| Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro Ala Pro Thr | | | |
| | 920 | 925 | 930 |
| cca tcc tcc agc acc cag cct gcc agt gag aat ggg tca gaa tcc aat | | | 2947 |
| Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu Ser Asn | | | |
| | 935 | 940 | 945 |
| ggc acc att gta cag cct cag gtg gag ccc agt ggg gaa ctc tca aca | | | 2995 |
| Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu Ser Thr | | | |
| | 950 | 955 | 960 |
| aca acc agt agc gct gca ccc act atg tgg cta gga gcc cag aat ggc | | | 3043 |
| Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly | | | |
| | 965 | 970 | 975 |
| tgg ctc tat gtg cat tca gcg gta gcc aac tgg aag aag tgt ctg cac | | | 3091 |
| Trp Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys Leu His | | | |
| 980 | 985 | 990 | 995 |
| tcc atc aag cta aaa gac tct gtg ctg agc ctg gtg cat gtc aaa ggc | | | 3139 |
| Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His Val Lys Gly | | | |
| | 1000 | 1005 | 1010 |

cga gtg ctg gta gct ctt gca gat ggg acc ctg gct atc ttc cat cgt 3187

Arg Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg

1015

1020

1025

gga gag gat ggc cag tgg gac ctg agc aac tac cac cta atg gac ctg 3235

Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Met Asp Leu

1030

1035

1040

ggc cac cca cac cac tcc atc cgc tgc atg gct gtt gtg aat gac cga 3283

Gly His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val Asn Asp Arg

1045

1050

1055

gtt tgg tgt ggc tac aag aac aag gtg cat gtt atc cag ccc aag aca 3331

Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln Pro Lys Thr

1060

1065

1070

1075

atg cag att gag aaa tca ttt gat gcc cac cca agg cgg gaa agc cag 3379

Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg Glu Ser Gln

1080

1085

1090

gta cgt cag ctg gcc tgg atc ggt gat gga gtg tgg gtc tct att cgc 3427

Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val Ser Ile Arg

1095

1100

1105

ttg gat tct acc ctt cgg ctc tac cat gct cac acc cac cag cac ctg 3475

Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His Gln His Leu

1110

1115

1120

cag gat gtg gac att gag ccc tat gtt agc aag atg cta gga acc ggc 3523
Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly Thr Gly

1125

1130

1135

aag ctg ggc ttc tcc ttc gtg cgc atc aca gcc tta ctc att gca ggc 3571
Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile Ala Gly

1140

1145

1150

1155

aac cgt ctg tgg gtg ggc act ggc aat ggg gtt gtc atc tcc atc ccc 3619
Asn Arg Leu Trp Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile Ser Ile Pro

1160

1165

1170

ttg act gag act gtg gtc ctg cat cga ggc cag ctc cta ggg ctc cga 3667
Leu Thr Glu Thr Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu Gly Leu Arg

1175

1180

1185

gcc aac aag aca tcc cca aca tct ggg gag ggg acc cgc cca ggg ggc 3715
Ala Asn Lys Thr Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg Pro Gly Gly

1190

1195

1200

atc atc cat gtg tat ggg gac gac agc agt gac aag gcc gcc agt agt 3763
Ile Ile His Val Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala Ala Ser Ser

1205

1210

1215

ttc atc ccc tac tgc tcc atg gca cag gct cag ctt tgc ttc cat ggg 3811
Phe Ile Pro Tyr Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys Phe His Gly

1220

1225

1230

1235

cac cgt gat gct gtc aaa ttc ttt gtc tct gtg cca gga aat gtg ctg 3859

His Arg Asp Ala Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu

1240

1245

1250

gcc act ctc aat ggc agt gtg cta gac agc cca tca gag ggc cct ggg 3907

Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly Pro Gly

1255

1260

1265

cct gct gca ccc gct gca gat gct gag ggc cag aag ttg aag aat gca 3955

Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys Asn Ala

1270

1275

1280

ctg gtg ctg agt ggt ggt gaa ggt tac att gac ttc cgt atc gga gac 4003

Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile Gly Asp

1285

1290

1295

gga gag gat gat gaa act gag gaa tgt gcc ggg gac gtg aac cag aca 4051

Gly Glu Asp Asp Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn Gln Thr

1300

1305

1310

1315

aag ccc tcg ttg tcc aag gct gag cgc agc cac atc atc gtg tgg cag 4099

Lys Pro Ser Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile Val Trp Gln

1320

1325

1330

gtg tcc tac acc cct gag tgagaccctg tccctacctga tgccaactgt 4147

Val Ser Tyr Thr Pro Glu

1335

acataggacc ctacctgcct gcctccccgc ctgttccctg gggcagccag gttcgtccat 4207

cccccttttaa cctctcaact tgcagctttt gcctgaggtc cagcccctag ctgttagaga 4267

gg

4269

【 0 3 4 1 】

<210> 4

<211> 4266

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (107)..(4114)

<400> 4

ggcctgggcg gcggcacatc ctaaggtagc ggctgcctga ggtgacagct gcccgtggat 60

tcgggccccg gaacgagccg cgctggcggc ggcggcggta gccgcg atg atg gag 115

Met Met Glu

1

atc cag atg gac gag gga gga ggt gtg gtg gtg tac caa gac gac tac 163

Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln Asp Asp Tyr

5

10

15

tgc tcg ggc tcg gtc atg tcg gag cgt gtg tcg ggc ctg gcg ggc tcc 211

Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu Ala Gly Ser

20

25

30

35

atc tac cgc gag ttc gag cgc ctc att cac tgc tat gac gag gag gtg 259

Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp Glu Glu Val

40

45

50

gtc aag gag ctc atg ccg ctg gtg gtg aac gtg ctg gag aac ctt gac 307

Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu Asn Leu Asp

55

60

65

tcg gtg ctg agc gag aac cag gag cac gag gtg gag ctg gag ctc cta 355

Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu Glu Leu Leu

70

75

80

cgc gag gac aac gag cag ctg ctc acg caa tac gag cgc gag aag gcg 403

Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala

85

90

95

ctg cgc aaa cag gcc gag gag aaa ttc atc gaa ttt gaa gat gcc ttg 451

Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu Asp Ala Leu

100

105

110

115

gaa caa gag aag aaa gaa ctc cag atc cag gta gaa cat tat gag ttt 499

Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His Tyr Glu Phe

120

125

130

cag aca cgc cag ctg gag cta aag gcc aaa aac tat gca gat cag att 547

Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Ile

135

140

145

tcc cga ctg gag gaa cga gaa tcg gag atg aag aag gaa tac aat gcc 595

Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu Tyr Asn Ala

150

155

160

ctg cac cag cgg cac aca gag atg atc cag acc tat gtg gaa cac att 643

Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val Glu His Ile

165

170

175

gaa aga tcc aag atg cag caa gtt ggg ggt agc ggc caa aca gaa agc 691

Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln Thr Glu Ser

180

185

190

195

agc ctg ccc ggg cgg agg aag gag cgt ccc acc tct ctg aat gtc ttc 739

Ser Leu Pro Gly Arg Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu Asn Val Phe

200

205

210

ccc ctg gct gat ggc atg gta cgt gca cag atg ggg ggc aag ctc gtg 787

Pro Leu Ala Asp Gly Met Val Arg Ala Gln Met Gly Gly Lys Leu Val

215

220

225

cct gcg ggg gac cac tgg cac ctg agt gac ctc ggc cag cta cag tcc 835

Pro Ala Gly Asp His Trp His Leu Ser Asp Leu Gly Gln Leu Gln Ser

230

235

240

agc tcc agc tac cag tgt cca aac gat gag atg tct gag tca ggc cag 883

Ser Ser Ser Tyr Gln Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu Ser Gly Gln

245

250

255

tcc tca gca gct gca aca ccc agt acc aca ggt acc aag tcc aac aca 931

Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys Ser Asn Thr
260 265 270 275

ccc acg tcc tcc gtg ccc tca gca gca gtc acg cca ctc aac gag agc 979
Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Glu Ser
280 285 290

cta cag ccc ctg ggg gac tat gtc agt gtc aca aag aac aac aag cag 1027
Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn Asn Lys Gln
295 300 305

gcc cga gag aag cgc aat agc cgt aac atg gag gtc cag gtc acc caa 1075
Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val Gln Val Thr Gln
310 315 320

gag atg cgg aac gtc agt atc ggc atg ggc agc agt gac gag tgg tcc 1123
Glu Met Arg Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser Asp Glu Trp Ser
325 330 335

gat gtt cag gac att atc gac tcc acc cca gag ctg gat gtg tgt cct 1171
Asp Val Gln Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu Asp Val Cys Pro
340 345 350 355

gaa acc cgt ctg gag cgc aca gga agc agc cca acc cag gga att gta 1219
Glu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr Gln Gly Ile Val
360 365 370

aac aaa gct ttt gga atc aac act gac tcc ttg tat cac gaa ctc tcc 1267
Asn Lys Ala Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr His Glu Leu Ser

375

380

385

acg gcg gga tct gag gtc atc ggg gat gtg gac gag gga gct gat ctc 1315
 Thr Ala Gly Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu Gly Ala Asp Leu
 390 395 400

cta ggg gag ttt tca gtg cgc gat gat ttt ttt gga atg ggc aaa gaa 1363
 Leu Gly Glu Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly Met Gly Lys Glu
 405 410 415

gtg ggg aac ctg ctg ctg gag aac tca cag ctt cta gag aca aaa aat 1411
 Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu Glu Thr Lys Asn
 420 425 430 435

gct tta aat gta gtg aag aat gac ctc att gct aag gtt gac caa ctg 1459
 Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val Asp Gln Leu
 440 445 450

tca gga gaa cag gag gtc ctg aag ggt gag ctg gaa gca gcc aag caa 1507
 Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys Gln
 455 460 465

gcg aaa gtc aag ctg gag aac cga atc aaa gag ctt gaa gaa gaa ctg 1555
 Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu Leu
 470 475 480

aag aga gtc aag tca gag gca gta act gcc cgc cgt gag ccc aga gaa 1603
 Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg Glu
 485 490 495

gag gtg gag gat gta agc agc tat ctc tgt aca gaa ttg gac aaa atc 1651
 Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys Ile
 500 505 510 515

ccc atg gcc cag cgc cga cgc ttc aca cgg gtg gag atg gcc cga gtg 1699
 Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg Val
 520 525 530

ctc atg gaa cgc aac cag tac aag gaa cgc ctc atg gag ctg cag gag 1747
 Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln Glu
 535 540 545

gct gtg agg tgg act gaa atg atc aga gca tca agg gaa cac cca tct 1795
 Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro Ser
 550 555 560

gtc cag gag aag aag aag tcc acc atc tgg cag ttc ttt agt cgc ctc 1843
 Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe Phe Ser Arg Leu
 565 570 575

ttc agc tcc tca tct agc ccc cct ccg gcc aaa cga tcc tac cca tct 1891
 Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg Ser Tyr Pro Ser
 580 585 590 595

gtg aac att cac tac aag tca ccc act gca gct ggc ttt agc cag cgt 1939
 Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly Phe Ser Gln Arg
 600 605 610

cgc agc cat gct ttg tgc cag atc tca gcc ggc agc agg ccc ctg gag 1987
Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg Pro Leu Glu

615

620

625

ttc ttc cct gat gat gac tgc acc tct tct gcc cgg cgg gag cag aag 2035
Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg Arg Glu Gln Lys

630

635

640

cgg gag cag tac cgc cag gtt cgt gaa cac gtg cgc aat gat gac ggg 2083
Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg Asn Asp Asp Gly

645

650

655

agg ctg cag gcc tgt ggg tgg agc ctg cct gcc aag tac aag cag ctg 2131
Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr Lys Gln Leu

660

665

670

675

agc ccc aat gga ggc cag gaa gac acc cgg atg aaa aat gtg cct gtc 2179
Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn Val Pro Val

680

685

690

cct gtg tac tgt cgc cct ctg gtg gag aag gac cct tcg aca aag ctg 2227
Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser Thr Lys Leu

695

700

705

tgg tgt gct gct ggt gtc aac ctg agt ggg tgg aag cca cat gaa gag 2275
Trp Cys Ala Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro His Glu Glu

710

715

720

gac tct agc aat gga ccc aag cct gta cca ggt cga gac cct ctg acc 2323

Asp Ser Ser Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp Pro Leu Thr

725

730

735

tgt gac cgg gaa gga gaa ggc gaa ccc aag agc aca cac cca tca cct 2371

Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr His Pro Ser Pro

740

745

750

755

gag aag aag aag gca aag gaa acc cct gag gca gat gct acc tcc agt 2419

Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala Thr Ser Ser

760

765

770

cgg gta tgg atc ctc acc agc acc ctg aca acc agc aag gtg gtg atc 2467

Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys Val Val Ile

775

780

785

att gat gcc aac cag cca ggc aca att gtg gat cag ttc aca gtc tgc 2515

Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe Thr Val Cys

790

795

800

aat gcc cac gtc ctg tgt atc tcc agc att cct gcg gcc agt gac agt 2563

Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala Ser Asp Ser

805

810

815

gac tat ccc cct ggg gag atg ttc cta gac agt gat gtg aac cct gaa 2611

Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp Val Asn Pro Glu

820

825

830

835

gat tca ggt gct gat ggt gtg ctg gct ggc atc acc ctg gtg ggg tgt 2659

Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu Val Gly Cys

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 840 | 845 | 850 | |
| gct acc cgc tgc aat gtt cca cgt agc aac tgt tcc tca cga gga gac | | | 2707 |
| Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser Arg Gly Asp | | | |
| 855 | 860 | 865 | |
| acc cca gta ctg gac aag ggg cag ggg gat gtg gcg acc act gcc aat | | | 2755 |
| Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr Thr Ala Asn | | | |
| 870 | 875 | 880 | |
| ggg aag gtc aac ccg tcc caa tcc aca gaa gaa gcc aca gaa gcc aca | | | 2803 |
| Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr Glu Ala Thr | | | |
| 885 | 890 | 895 | |
| gag gtg cca gac cct ggt ccc agc gag tca gaa gca acg aca gtc cgg | | | 2851 |
| Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr Thr Val Arg | | | |
| 900 | 905 | 910 | 915 |
| ccc ggg cct ctc aca gag cat gtc ttt act gac cca gca ccc acc cca | | | 2899 |
| Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro Ala Pro Thr Pro | | | |
| 920 | 925 | 930 | |
| tcc tcc agc acc cag cct gcc agt gag aat ggg tca gaa tcc aat ggc | | | 2947 |
| Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu Ser Asn Gly | | | |
| 935 | 940 | 945 | |
| acc att gta cag cct cag gtg gag ccc agt ggg gaa ctc tca aca aca | | | 2995 |
| Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu Ser Thr Thr | | | |
| 950 | 955 | 960 | |

acc agt agc gct gca ccc act atg tgg cta gga gcc cag aat ggc tgg 3043

Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly Trp

965

970

975

ctc tat gtg cat tca gcg gta gcc aac tgg aag aag tgt ctg cac tcc 3091

Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys Leu His Ser

980

985

990

995

atc aag cta aaa gac tct gtg ctg agc ctg gtg cat gtc aaa ggc cga 3139

Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His Val Lys Gly Arg

1000

1005

1010

gtg ctg gta gct ctt gca gat ggg acc ctg gct atc ttc cat cgt gga 3187

Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg Gly

1015

1020

1025

gag gat ggc cag tgg gac ctg agc aac tac cac cta atg gac ctg ggc 3235

Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Met Asp Leu Gly

1030

1035

1040

cac cca cac cac tcc atc cgc tgc atg gct gtt gtg aat gac cga gtt 3283

His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val Asn Asp Arg Val

1045

1050

1055

tgg tgt ggc tac aag aac aag gtg cat gtt atc cag ccc aag aca atg 3331

Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln Pro Lys Thr Met

1060

1065

1070

1075

cag att gag aaa tca ttt gat gcc cac cca agg cgg gaa agc cag gta 3379

Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg Glu Ser Gln Val

1080

1085

1090

cgt cag ctg gcc tgg atc ggt gat gga gtg tgg gtc tct att cgc ttg 3427

Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val Ser Ile Arg Leu

1095

1100

1105

gat tct acc ctt cgg ctc tac cat gct cac acc cac cag cac ctg cag 3475

Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His Gln His Leu Gln

1110

1115

1120

gat gtg gac att gag ccc tat gtt agc aag atg cta gga acc ggc aag 3523

Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly Thr Gly Lys

1125

1130

1135

ctg ggc ttc tcc ttc gtg cgc atc aca gcc tta ctc att gca ggc aac 3571

Leu Gly Phe Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile Ala Gly Asn

1140

1145

1150

1155

cgt ctg tgg gtg ggc act ggc aat ggg gtt gtc atc tcc atc ccc ttg 3619

Arg Leu Trp Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile Ser Ile Pro Leu

1160

1165

1170

act gag act gtg gtc ctg cat cga ggc cag ctc cta ggg ctc cga gcc 3667

Thr Glu Thr Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu Gly Leu Arg Ala

1175

1180

1185

aac aag aca tcc cca aca tct ggg gag ggg acc cgc cca ggg ggc atc 3715

Asn Lys Thr Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg Pro Gly Gly Ile

1190

1195

1200

atc cat gtg tat ggg gac gac agc agt gac aag gcc gcc agt agt ttc 3763

Ile His Val Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala Ala Ser Ser Phe

1205

1210

1215

atc ccc tac tgc tcc atg gca cag gct cag ctt tgc ttc cat ggg cac 3811

Ile Pro Tyr Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys Phe His Gly His

1220

1225

1230

1235

cgt gat gct gtc aaa ttc ttt gtc tct gtg cca gga aat gtg ctg gcc 3859

Arg Asp Ala Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu Ala

1240

1245

1250

act ctc aat ggc agt gtg cta gac agc cca tca gag ggc cct ggg cct 3907

Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly Pro Gly Pro

1255

1260

1265

gct gca ccc gct gca gat gct gag ggc cag aag ttg aag aat gca ctg 3955

Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys Asn Ala Leu

1270

1275

1280

gtg ctg agt ggt ggt gaa ggt tac att gac ttc cgt atc gga gac gga 4003

Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile Gly Asp Gly

1285

1290

1295

gag gat gat gaa act gag gaa tgt gcc ggg gac gtg aac cag aca aag 4051

Glu Asp Asp Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn Gln Thr Lys

1300

1305

1310

1315

ccc tcg ttg tcc aag gct gag cgc agc cac atc atc gtg tgg cag gtg 4099

Pro Ser Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile Val Trp Gln Val

1320

1325

1330

tcc tac acc cct gag tgagaccctg tectacctga tgccaactgt acataggacc 4154

Ser Tyr Thr Pro Glu

1335

ctacctgcct gcctccccgc ctgttccctg gggcagccag gttcgtccat ccccttttaa 4214

cctctcaact tgcagctttt gcctgaggtc cagcccctag ctgttagaga gg 4266

【 0 3 4 2 】

<210> 5

<211> 1450

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (41)..(1330)

<400> 5

ggcgaattca tggctgtgga aacccccgcc caattaagca atg tca ggc gtc cga 55

Met Ser Gly Val Arg

1

5

cct ccc atc atg aac ggg ccc atg cac ccc cgg ccc ctg gtg gcg ctg 103

Pro Pro Ile Met Asn Gly Pro Met His Pro Arg Pro Leu Val Ala Leu

10

15

20

ctg gat ggc cgg gac tgc aca gtg gag atg cct atc ctg aag gat gtg 151

Leu Asp Gly Arg Asp Cys Thr Val Glu Met Pro Ile Leu Lys Asp Val

25

30

35

gcc aca gta gcc ttc tgt gat gca cag tcc aca cag gag atc cat gag 199

Ala Thr Val Ala Phe Cys Asp Ala Gln Ser Thr Gln Glu Ile His Glu

40

45

50

aag gta ctg aat gag gct gtg ggt gcc ctg atg tac cat acc atc aca 247

Lys Val Leu Asn Glu Ala Val Gly Ala Leu Met Tyr His Thr Ile Thr

55

60

65

ctg acc aga gaa gat ctg gag aag ttt aaa gct ctt aga atc atc gtc 295

Leu Thr Arg Glu Asp Leu Glu Lys Phe Lys Ala Leu Arg Ile Ile Val

70

75

80

85

cga att ggc agc ggg ttt gac aat atc gac atc aag tca gct ggg gat 343

Arg Ile Gly Ser Gly Phe Asp Asn Ile Asp Ile Lys Ser Ala Gly Asp

90

95

100

cta ggc atc gca gtg tgc aat gtg ccg gca gca tct gtg gaa gaa acg 391

Leu Gly Ile Ala Val Cys Asn Val Pro Ala Ala Ser Val Glu Glu Thr

105

110

115

gca gac tcc acc ctg tgc cac atc ctg aac ctg tac cga cga acc acc 439
Ala Asp Ser Thr Leu Cys His Ile Leu Asn Leu Tyr Arg Arg Thr Thr
120 125 130

tgg cta cac cag gcc ctt cgg gaa ggc act cga gtc cag agt gta gag 487
Trp Leu His Gln Ala Leu Arg Glu Gly Thr Arg Val Gln Ser Val Glu
135 140 145

cag atc cga gag gtg gct tca gga gct gcc agg atc cgt gga gag acc 535
Gln Ile Arg Glu Val Ala Ser Gly Ala Ala Arg Ile Arg Gly Glu Thr
150 155 160 165

ttg ggc atc att gga cta ggt cgt gtg ggc cag gcg gtg gca ctt cgg 583
Leu Gly Ile Ile Gly Leu Gly Arg Val Gly Gln Ala Val Ala Leu Arg
170 175 180

gca aag gct ttt ggc ttc aac gtc ctc ttc tat gat cca tac cta tct 631
Ala Lys Ala Phe Gly Phe Asn Val Leu Phe Tyr Asp Pro Tyr Leu Ser
185 190 195

gat gga atc gag cgg gcc ctg ggg cta cag cgc gtg agc acg ctg cag 679
Asp Gly Ile Glu Arg Ala Leu Gly Leu Gln Arg Val Ser Thr Leu Gln
200 205 210

gac ctg ctc ttc cac agt gac tgc gtt acc ctg cat tgc ggc ctc aat 727
Asp Leu Leu Phe His Ser Asp Cys Val Thr Leu His Cys Gly Leu Asn
215 220 225

gag cac aac cac cac ctc atc aat gac ttt act gtc aag cag atg aga 775

Glu His Asn His His Leu Ile Asn Asp Phe Thr Val Lys Gln Met Arg
230 235 240 245

caa gga gcc ttt ctg gtg aac aca gcc cgt ggt ggc ctg gtg gat gag 823
Gln Gly Ala Phe Leu Val Asn Thr Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp Glu
250 255 260

aag gca gtg gcc cag gcc ctg aag gaa ggg cgg atc cgt ggc gca gcg 871
Lys Ala Val Ala Gln Ala Leu Lys Glu Gly Arg Ile Arg Gly Ala Ala
265 270 275

ctg gac gtg cat gag tca gag ccc ttc agc ttt agc cag gga ccc tta 919
Leu Asp Val His Glu Ser Glu Pro Phe Ser Phe Ser Gln Gly Pro Leu
280 285 290

aag gat gca ccc aac ctc atc tgc aca ccc cat gct gca tgg tac agt 967
Lys Asp Ala Pro Asn Leu Ile Cys Thr Pro His Ala Ala Trp Tyr Ser
295 300 305

gag cag gcg tcc att gag atg aga gag gag gca gcc cgg gaa atc cgg 1015
Glu Gln Ala Ser Ile Glu Met Arg Glu Glu Ala Ala Arg Glu Ile Arg
310 315 320 325

cga gcc atc aca ggc cgg atc cca gat agc ttg aaa aac tgt gtc aac 1063
Arg Ala Ile Thr Gly Arg Ile Pro Asp Ser Leu Lys Asn Cys Val Asn
330 335 340

aag gac cac ctg aca gcc gcc acg cac tgg gcc agc atg gac cct gct 1111
Lys Asp His Leu Thr Ala Ala Thr His Trp Ala Ser Met Asp Pro Ala

345

350

355

gtg gtg cac cct gag ctc aat ggg gct gcc tac agc agg tac cct cca 1159

Val Val His Pro Glu Leu Asn Gly Ala Ala Tyr Ser Arg Tyr Pro Pro

360

365

370

ggc gtc gtg agt gtg gcc ccc act ggc atc cca gct gct gtg gaa ggg 1207

Gly Val Val Ser Val Ala Pro Thr Gly Ile Pro Ala Ala Val Glu Gly

375

380

385

att gtt ccc agt gcc atg tcc ctg tct cat ggc ctg ccc cct gtg gcc 1255

Ile Val Pro Ser Ala Met Ser Leu Ser His Gly Leu Pro Pro Val Ala

390

395

400

405

cac cca ccc cac gct ccc tct cct ggc cag act gtc aag cct gag gcg 1303

His Pro Pro His Ala Pro Ser Pro Gly Gln Thr Val Lys Pro Glu Ala

410

415

420

gat aga gac cat acg agt gac cag ttg tagcctgtga ggagctgtcc 1350

Asp Arg Asp His Thr Ser Asp Gln Leu

425

430

agccttggca cctggtggag ggtgctgcac gctcttggac ccaagtgtgc agaggtggca 1410

tccagtgtgg gccctagcac tccagagact ggcccgggcg 1450

【 0 3 4 3 】

<210> 6

<211> 4684

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (150)..(4673)

<400> 6

gaagacacct actgtgatga taaggttgct tctgccatct caggccagtg aaagtgcata 60

tccgaagcct gtgttgaacg agaaggcagt accgctgttg agacaagtcc aaaggctagg 120

ccagggactg tccttagggg ctctcgtt atg atg gct gga gaa ggg tca acc 173

Met Met Ala Gly Glu Gly Ser Thr

1

5

att act agc cgt atc aag aac ttg ctg agg tct cca tcc atc aaa tta 221

Ile Thr Ser Arg Ile Lys Asn Leu Leu Arg Ser Pro Ser Ile Lys Leu

10

15

20

cgc aga agt aaa gca gga aac cgg aga gag gac ctc agc tcc aag gta 269

Arg Arg Ser Lys Ala Gly Asn Arg Arg Glu Asp Leu Ser Ser Lys Val

25

30

35

40

acc ttg gag aag gtc ctg gga gtg aca gta tct gga gga aga gga ctt 317

Thr Leu Glu Lys Val Leu Gly Val Thr Val Ser Gly Gly Arg Gly Leu

45

50

55

gct tgt gag ccc cga tct ggc tta gtt gcc tac cca gca ggg tgt gtg 365
Ala Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu Val Ala Tyr Pro Ala Gly Cys Val

60

65

70

gtc gtc ctc ttc aat ccc cgg aag cac aaa cag cac cac atc ctc aac 413
Val Val Leu Phe Asn Pro Arg Lys His Lys Gln His His Ile Leu Asn

75

80

85

agc tcc agg aaa acc att act gcc ctt gcc ttc tcc cct gat ggc aag 461
Ser Ser Arg Lys Thr Ile Thr Ala Leu Ala Phe Ser Pro Asp Gly Lys

90

95

100

tac ttg gtc act gga gag agt ggg cac atg cct gcc gtg cgg gtt tgg 509
Tyr Leu Val Thr Gly Glu Ser Gly His Met Pro Ala Val Arg Val Trp
105 110 115 120

gat gtg gct gaa cgt agc cag gtg gca gag cta cag gag cat aag tat 557
Asp Val Ala Glu Arg Ser Gln Val Ala Glu Leu Gln Glu His Lys Tyr

125

130

135

ggt gtg gct tgt gtg gct ttc tcc cca agt gcc aag tac att gtg tct 605
Gly Val Ala Cys Val Ala Phe Ser Pro Ser Ala Lys Tyr Ile Val Ser

140

145

150

gtg ggc tac cag cat gac atg att gtc aac gtg tgg gcc tgg aag aaa 653
Val Gly Tyr Gln His Asp Met Ile Val Asn Val Trp Ala Trp Lys Lys

155

160

165

aac att gta gtg gcc tcc aac aaa gta tcc agt cgg gta acc gca gtg 701

Asn Ile Val Val Ala Ser Asn Lys Val Ser Ser Arg Val Thr Ala Val

170

175

180

tcc ttt tct gaa gac tgc agc tac ttt gtc act gca ggc aac cgg cac 749

Ser Phe Ser Glu Asp Cys Ser Tyr Phe Val Thr Ala Gly Asn Arg His

185

190

195

200

atc aaa ttc tgg tac ctg gat gac agt aag acc tca aag gtg aac gcc 797

Ile Lys Phe Trp Tyr Leu Asp Asp Ser Lys Thr Ser Lys Val Asn Ala

205

210

215

act gtg ccc ctg ctg ggc cgc tcg ggg ctg ctg ggg gag ctg agg aac 845

Thr Val Pro Leu Leu Gly Arg Ser Gly Leu Leu Gly Glu Leu Arg Asn

220

225

230

aac ctg ttc act gat gtg gcc tgt ggc cga ggg gaa aag gct gat agc 893

Asn Leu Phe Thr Asp Val Ala Cys Gly Arg Gly Glu Lys Ala Asp Ser

235

240

245

act ttc tgt atc acg tcg tcg ggg ctg ctg tgc gag ttc agc gat cgc 941

Thr Phe Cys Ile Thr Ser Ser Gly Leu Leu Cys Glu Phe Ser Asp Arg

250

255

260

agg ctt ctg gac aaa tgg gtg gag cta agg aac aca gac agc ttc aca 989

Arg Leu Leu Asp Lys Trp Val Glu Leu Arg Asn Thr Asp Ser Phe Thr

265

270

275

280

acc act gtg gcc cac tgc atc tct gtc acc caa gaa tac atc ttc tgt 1037

Thr Thr Val Ala His Cys Ile Ser Val Thr Gln Glu Tyr Ile Phe Cys

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 285 | 290 | 295 | |
| ggc tgt gct gat ggc acg gtg cgc ctt ttc aat cct tcc aac ctg cac | | | 1085 |
| Gly Cys Ala Asp Gly Thr Val Arg Leu Phe Asn Pro Ser Asn Leu His | | | |
| 300 | 305 | 310 | |
| ttc ctc agt acc cta ccc aga ccc cat gct ctt gga aca gac att gcc | | | 1133 |
| Phe Leu Ser Thr Leu Pro Arg Pro His Ala Leu Gly Thr Asp Ile Ala | | | |
| 315 | 320 | 325 | |
| agc atc act gag gcc agt cgc ctc ttt tct gga ggg gtc aat gca agg | | | 1181 |
| Ser Ile Thr Glu Ala Ser Arg Leu Phe Ser Gly Gly Val Asn Ala Arg | | | |
| 330 | 335 | 340 | |
| tac cca gac acc att gcc ttg acc ttc gat cca act aat cag tgg cta | | | 1229 |
| Tyr Pro Asp Thr Ile Ala Leu Thr Phe Asp Pro Thr Asn Gln Trp Leu | | | |
| 345 | 350 | 355 | 360 |
| tct tgt gta tac aac gac cac agc ata tat gtt tgg gat gtg agg gac | | | 1277 |
| Ser Cys Val Tyr Asn Asp His Ser Ile Tyr Val Trp Asp Val Arg Asp | | | |
| 365 | 370 | 375 | |
| ccc aag aaa gtg ggg aag gtg tac tcc gct ctg tat cac tcc tcc tgt | | | 1325 |
| Pro Lys Lys Val Gly Lys Val Tyr Ser Ala Leu Tyr His Ser Ser Cys | | | |
| 380 | 385 | 390 | |
| gtc tgg agt gtg gag gtc tac cct gag atc aag gac agt cac cag gcc | | | 1373 |
| Val Trp Ser Val Glu Val Tyr Pro Glu Ile Lys Asp Ser His Gln Ala | | | |
| 395 | 400 | 405 | |

tgt ctt ccc ctc agt tcc ttt att act tgc tcc tca gac aac acc atc 1421

Cys Leu Pro Leu Ser Ser Phe Ile Thr Cys Ser Ser Asp Asn Thr Ile

410

415

420

cgc ctg tgg aac aca gag agc tct ggg gta cat ggc tct acc ctg cac 1469

Arg Leu Trp Asn Thr Glu Ser Ser Gly Val His Gly Ser Thr Leu His

425

430

435

440

cgt aac atc ctc agc aat gat ctc att aag atc atc tat gtg gat ggg 1517

Arg Asn Ile Leu Ser Asn Asp Leu Ile Lys Ile Ile Tyr Val Asp Gly

445

450

455

aac act cag gct ttg ttg gac act gag ctg cct gga gga gac aaa gct 1565

Asn Thr Gln Ala Leu Leu Asp Thr Glu Leu Pro Gly Gly Asp Lys Ala

460

465

470

gat ggg tcg ctg atg gac ccc cga gtg ggc atc cgg tcc gtg tgt att 1613

Asp Gly Ser Leu Met Asp Pro Arg Val Gly Ile Arg Ser Val Cys Ile

475

480

485

agc ccc aat gga cag cac ctg gcc tcg gga gac cgc atg ggg aca ctt 1661

Ser Pro Asn Gly Gln His Leu Ala Ser Gly Asp Arg Met Gly Thr Leu

490

495

500

agg ata cat gaa ctg cag tcc ctg agt gag atg ctg aaa gtg gag gcc 1709

Arg Ile His Glu Leu Gln Ser Leu Ser Glu Met Leu Lys Val Glu Ala

505

510

515

520

cac gac tct gag atc ttg tgc ctg gag tac tct aag cca gac aca ggt 1757

His Asp Ser Glu Ile Leu Cys Leu Glu Tyr Ser Lys Pro Asp Thr Gly

525

530

535

ttg aaa ctg cta gca tcg gca agc cgg gac cgt ctg atc cac gag ctg 1805

Leu Lys Leu Leu Ala Ser Ala Ser Arg Asp Arg Leu Ile His Glu Leu

540

545

550

gat gct ggc cgg gaa tat agt cta cag cag aca ctg gat gag cat tca 1853

Asp Ala Gly Arg Glu Tyr Ser Leu Gln Gln Thr Leu Asp Glu His Ser

555

560

565

tct tcc atc act gct gtc aag ttt gca gcc agt gat ggg caa gtg cga 1901

Ser Ser Ile Thr Ala Val Lys Phe Ala Ala Ser Asp Gly Gln Val Arg

570

575

580

atg atc agc tgt ggt gca gac aag agc att tac ttc cga act gca cag 1949

Met Ile Ser Cys Gly Ala Asp Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Thr Ala Gln

585

590

595

600

aag tct gga gaa gga gta cag ttt aca cga acg cac cac gtg gta cgg 1997

Lys Ser Gly Glu Gly Val Gln Phe Thr Arg Thr His His Val Val Arg

605

610

615

aag aca act ctc tat gac atg gat gtg gag ccc agc tgg aag tac acg 2045

Lys Thr Thr Leu Tyr Asp Met Asp Val Glu Pro Ser Trp Lys Tyr Thr

620

625

630

gcc atc ggc tgc caa gac cgg aat att cgg atc ttt aac att agc agc 2093

Ala Ile Gly Cys Gln Asp Arg Asn Ile Arg Ile Phe Asn Ile Ser Ser
635 640 645

gga aag cag aaa aag ctg ttt aaa ggg tca cag ggt gaa gat ggc act 2141
Gly Lys Gln Lys Lys Leu Phe Lys Gly Ser Gln Gly Glu Asp Gly Thr
650 655 660

ctc att aag gtg cag aca gac ccc tca ggg atc tac att gcc act agc 2189
Leu Ile Lys Val Gln Thr Asp Pro Ser Gly Ile Tyr Ile Ala Thr Ser
665 670 675 680

tgt tcc gat aag aat ctc tcc att ttt gac ttc tcc tca ggc gag tgt 2237
Cys Ser Asp Lys Asn Leu Ser Ile Phe Asp Phe Ser Ser Gly Glu Cys
685 690 695

gtg gcc acc atg ttt ggc cac tca gag att gtc act ggc atg aaa ttt 2285
Val Ala Thr Met Phe Gly His Ser Glu Ile Val Thr Gly Met Lys Phe
700 705 710

agt aac gat tgc aaa cat ctc atc tct gtg tca ggg gac agc tgc atc 2333
Ser Asn Asp Cys Lys His Leu Ile Ser Val Ser Gly Asp Ser Cys Ile
715 720 725

ttt gtc tgg cgt ctg agc tct gag atg acc atc agc atg agg cag cgc 2381
Phe Val Trp Arg Leu Ser Ser Glu Met Thr Ile Ser Met Arg Gln Arg
730 735 740

ctg cgt gag cgg cgg cag cgc cag cga ggg atc aag cag caa gga cca 2429
Leu Arg Glu Arg Arg Gln Arg Gln Arg Gly Ile Lys Gln Gln Gly Pro

| | | | |
|--|-----|-----|-----|
| 745 | 750 | 755 | 760 |
| acg tct ccc cag agg gct tct gga gcc aag cag cac cat gct cca gtg 2477 | | | |
| Thr Ser Pro Gln Arg Ala Ser Gly Ala Lys Gln His His Ala Pro Val | | | |
| | 765 | 770 | 775 |
| gta ccc cct tct gga cca gct ctt tcc tca gac agt gac aag gag gga 2525 | | | |
| Val Pro Pro Ser Gly Pro Ala Leu Ser Ser Asp Ser Asp Lys Glu Gly | | | |
| | 780 | 785 | 790 |
| gaa gat gag ggt act gaa gaa gaa gaa ttg cca gct ctg ccc atc ctt 2573 | | | |
| Glu Asp Glu Gly Thr Glu Glu Glu Glu Leu Pro Ala Leu Pro Ile Leu | | | |
| | 795 | 800 | 805 |
| agc aag agc acc aag aaa gaa cta gcc tca ggc tct agt cca gcc ttg 2621 | | | |
| Ser Lys Ser Thr Lys Lys Glu Leu Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Leu | | | |
| | 810 | 815 | 820 |
| ctc cga agc ctg tcc cac tgg gaa atg agt cgg gca caa gag acc atg 2669 | | | |
| Leu Arg Ser Leu Ser His Trp Glu Met Ser Arg Ala Gln Glu Thr Met | | | |
| 825 | 830 | 835 | 840 |
| gag tac ctg gac cca gct cct gta gct aac aca gga cct aaa aga aga 2717 | | | |
| Glu Tyr Leu Asp Pro Ala Pro Val Ala Asn Thr Gly Pro Lys Arg Arg | | | |
| | 845 | 850 | 855 |
| ggg cgc tgg gct cag cca ggc gtg gag ctg agt gtt cgc tcc atg ttg 2765 | | | |
| Gly Arg Trp Ala Gln Pro Gly Val Glu Leu Ser Val Arg Ser Met Leu | | | |
| | 860 | 865 | 870 |

gac ctg aga cag ata gag acc tta gcc cca agc cct cga ggc ccc agc 2813

Asp Leu Arg Gln Ile Glu Thr Leu Ala Pro Ser Pro Arg Gly Pro Ser

875

880

885

cag gac tca ctg gct gtg tcc cca gct ggt cct ggg aag cat ggt cca 2861

Gln Asp Ser Leu Ala Val Ser Pro Ala Gly Pro Gly Lys His Gly Pro

890

895

900

cag gcc cct gag ctg tca tgt gtc agt cag aat gaa agg gcc cct cgg 2909

Gln Ala Pro Glu Leu Ser Cys Val Ser Gln Asn Glu Arg Ala Pro Arg

905

910

915

920

ctt cag acc tcc caa ccc tgc tcc tgc ccc gac att atc caa ttg ttg 2957

Leu Gln Thr Ser Gln Pro Cys Ser Cys Pro Asp Ile Ile Gln Leu Leu

925

930

935

tca caa gag gaa gga gtc ttt gcc caa gat ctg gag cct gca ccc att 3005

Ser Gln Glu Glu Gly Val Phe Ala Gln Asp Leu Glu Pro Ala Pro Ile

940

945

950

gaa gat ggt att gtc tac ccg gaa ccc agt gac agc cct acc atg gat 3053

Glu Asp Gly Ile Val Tyr Pro Glu Pro Ser Asp Ser Pro Thr Met Asp

955

960

965

acc agt gcg ttt cag gtg cag gct cca acc gga gga tcc cta gga aga 3101

Thr Ser Ala Phe Gln Val Gln Ala Pro Thr Gly Gly Ser Leu Gly Arg

970

975

980

atg tac cca ggc agc agg ggc tca gaa aag cac agt cct gac agt gca 3149

Met Tyr Pro Gly Ser Arg Gly Ser Glu Lys His Ser Pro Asp Ser Ala

985 990 995 1000

tgc tct gtg gat tac agc agc agc cgg ctt tcc agc cct gaa cac cct 3197

Cys Ser Val Asp Tyr Ser Ser Ser Arg Leu Ser Ser Pro Glu His Pro

1005 1010 1015

aat gaa gac tct gag agc aca gag ccc cta agt gtg gat ggc atc tcc 3245

Asn Glu Asp Ser Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Val Asp Gly Ile Ser

1020 1025 1030

tca gac ctg gaa gag cca gcc gag ggt gat gaa gac gag gaa gaa gag 3293

Ser Asp Leu Glu Glu Pro Ala Glu Gly Asp Glu Asp Glu Glu Glu Glu

1035 1040 1045

gga ggc act ggc ctc tgt ggg cta cag gaa ggc ggc cct cgt acc cca 3341

Gly Gly Thr Gly Leu Cys Gly Leu Gln Glu Gly Gly Pro Arg Thr Pro

1050 1055 1060

gat cag gaa cag ttt cta aaa cag ctc ttt gag act ctg gcc aat ggg 3389

Asp Gln Glu Gln Phe Leu Lys Gln Leu Phe Glu Thr Leu Ala Asn Gly

1065 1070 1075 1080

act gct cca ggg ggc cca gca cgg gtg cta gag agg aca gag tct cgg 3437

Thr Ala Pro Gly Gly Pro Ala Arg Val Leu Glu Arg Thr Glu Ser Arg

1085 1090 1095

agc atc tca tca cga ttc ctt ctg caa gtg cag acc ctc cca ctc agg 3485

Ser Ile Ser Ser Arg Phe Leu Leu Gln Val Gln Thr Leu Pro Leu Arg

1100

1105

1110

gaa cca tcc cta tcc tcc tca ggc ttg gcc ctg acg tcc aga cct gac 3533

Glu Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gly Leu Ala Leu Thr Ser Arg Pro Asp

1115

1120

1125

cag gta tca cag gtg tct ggt gag cag ctg aaa ggc agt ggt gcc act 3581

Gln Val Ser Gln Val Ser Gly Glu Gln Leu Lys Gly Ser Gly Ala Thr

1130

1135

1140

cct cca gga gca ccc cca gaa atg gaa ccc tct tct ggc aac tct ggc 3629

Pro Pro Gly Ala Pro Pro Glu Met Glu Pro Ser Ser Gly Asn Ser Gly

1145

1150

1155

1160

ccc aag cag gtg gct cct gtg ctg ttg aca cga cgg cgt aac aac ttg 3677

Pro Lys Gln Val Ala Pro Val Leu Leu Thr Arg Arg Arg Asn Asn Leu

1165

1170

1175

gac aac agc tgg gcc tcc aag aaa atg gct gca acc cgg cct tta gct 3725

Asp Asn Ser Trp Ala Ser Lys Lys Met Ala Ala Thr Arg Pro Leu Ala

1180

1185

1190

gga ctc cag aaa gcc cag tct gtg cat agt ttg gta cca cag gat gag 3773

Gly Leu Gln Lys Ala Gln Ser Val His Ser Leu Val Pro Gln Asp Glu

1195

1200

1205

gtg cct tca tca cgt cca ctg ctc ttc cgg gag gca gag acc cag ggc 3821

Val Pro Ser Ser Arg Pro Leu Leu Phe Arg Glu Ala Glu Thr Gln Gly

| | | | |
|--|------|------|------|
| 1210 | 1215 | 1220 | |
| agc tta gga tcc ctg cca caa gct ggt ggc tgc tca tct cag ccc cac 3869 | | | |
| Ser Leu Gly Ser Leu Pro Gln Ala Gly Gly Cys Ser Ser Gln Pro His | | | |
| 1225 | 1230 | 1235 | 1240 |
| tcc tac cag aac cac acc acc agt tct atg gcc aag cta gcg cgt agt 3917 | | | |
| Ser Tyr Gln Asn His Thr Thr Ser Ser Met Ala Lys Leu Ala Arg Ser | | | |
| | 1245 | 1250 | 1255 |
| att tct gtt ggc gag aat ccg ggc ctg gca act gaa cct caa gct cct 3965 | | | |
| Ile Ser Val Gly Glu Asn Pro Gly Leu Ala Thr Glu Pro Gln Ala Pro | | | |
| | 1260 | 1265 | 1270 |
| gca ccg atc cga atc tca cca ttc aac aaa cta gct ctg cct agc agg 4013 | | | |
| Ala Pro Ile Arg Ile Ser Pro Phe Asn Lys Leu Ala Leu Pro Ser Arg | | | |
| | 1275 | 1280 | 1285 |
| gct cac ctt gtc ctg gac atc ccc aaa cca ctt cct gac cgt cct act 4061 | | | |
| Ala His Leu Val Leu Asp Ile Pro Lys Pro Leu Pro Asp Arg Pro Thr | | | |
| | 1290 | 1295 | 1300 |
| ctg acc aca ttc tca cct gta tcc aag ggc ctg acc cac aat gaa aca 4109 | | | |
| Leu Thr Thr Phe Ser Pro Val Ser Lys Gly Leu Thr His Asn Glu Thr | | | |
| 1305 | 1310 | 1315 | 1320 |
| gaa caa tcg ggg ccc ctt cgt gag cct agg aag gct cat act aca gtt 4157 | | | |
| Glu Gln Ser Gly Pro Leu Arg Glu Pro Arg Lys Ala His Thr Thr Val | | | |
| | 1325 | 1330 | 1335 |

gaa aag cac tcc tgt tta ggg gag ggt act act cat aaa tct agg aca 4205

Glu Lys His Ser Cys Leu Gly Glu Gly Thr Thr His Lys Ser Arg Thr

1340

1345

1350

gag tgc cag gct tat cct gga ccc aac cac ccc tgt cgc cag caa ctg 4253

Glu Cys Gln Ala Tyr Pro Gly Pro Asn His Pro Cys Arg Gln Gln Leu

1355

1360

1365

cca gtc aac aac ctt ctc caa gct gag agc ttg cag ccc ctg tcc cct 4301

Pro Val Asn Asn Leu Leu Gln Ala Glu Ser Leu Gln Pro Leu Ser Pro

1370

1375

1380

gag aag act cgt aac ccc gtg gaa agc agc agg cca ggg gta gcc ctg 4349

Glu Lys Thr Arg Asn Pro Val Glu Ser Ser Arg Pro Gly Val Ala Leu

1385

1390

1395

1400

agc cag gac tca gaa ctg gcc ttg agt ctg caa cag tgt gaa cag ctc 4397

Ser Gln Asp Ser Glu Leu Ala Leu Ser Leu Gln Gln Cys Glu Gln Leu

1405

1410

1415

gtg gca gag ctc cag ggg aat gta cgc cag gca gtg gag ctc tac cgc 4445

Val Ala Glu Leu Gln Gly Asn Val Arg Gln Ala Val Glu Leu Tyr Arg

1420

1425

1430

gcg gtg acc agc tgt aag aca cct tcg gca gag caa agt cac atc acc 4493

Ala Val Thr Ser Cys Lys Thr Pro Ser Ala Glu Gln Ser His Ile Thr

1435

1440

1445

cgt ctc ctg aga gac acc ttc tct ccg gtg cga cag gag ctc gag gtt 4541

Arg Leu Leu Arg Asp Thr Phe Ser Pro Val Arg Gln Glu Leu Glu Val

1450

1455

1460

ctg gct ggg gca gtg ctg tcc agc cca ggt ggc agc cct ggg gct gtg 4589

Leu Ala Gly Ala Val Leu Ser Ser Pro Gly Gly Ser Pro Gly Ala Val

1465

1470

1475

1480

gcg gct gag cag acg cag gcc ctg ttg gag caa tac tcc gag cta ctg 4637

Ala Ala Glu Gln Thr Gln Ala Leu Leu Glu Gln Tyr Ser Glu Leu Leu

1485

1490

1495

cta aga gct gtg gag cgg cgc atg gag cgc aga ctc tgagctcctg a 4684

Leu Arg Ala Val Glu Arg Arg Met Glu Arg Arg Leu

1500

1505

【 0 3 4 4 】

<210> 7

<211> 734

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(732)

<400> 7

agt agc aaa tat tca aac gag tcg aga agc cag gcg gac tct ggc ttc 48

Ser Ser Lys Tyr Ser Asn Glu Ser Arg Ser Gln Ala Asp Ser Gly Phe

1 5 10 15

ctg ggc ctg cgg ccg acc tcg gtg gat ccc gct ctg agg cgg cgg cgg 96

Leu Gly Leu Arg Pro Thr Ser Val Asp Pro Ala Leu Arg Arg Arg Arg

20 25 30

cgg ggc ccc aga aac aag aag cgc ggc tgg agg agg ctc gcc gag gag 144

Arg Gly Pro Arg Asn Lys Lys Arg Gly Trp Arg Arg Leu Ala Glu Glu

35 40 45

ccg ctg ggc tta gag gtc gac cag ttc ctg gaa gac gtc cgg cta cag 192

Pro Leu Gly Leu Glu Val Asp Gln Phe Leu Glu Asp Val Arg Leu Gln

50 55 60

gag cgc acg acc ggt ggc ttg ttg gca gag gcc cca aac gaa aag ctc 240

Glu Arg Thr Thr Gly Gly Leu Leu Ala Glu Ala Pro Asn Glu Lys Leu

65 70 75 80

ttc ttc gtg gac aca gga ttc aag aga aaa gaa cca aga aag aag agg 288

Phe Phe Val Asp Thr Gly Phe Lys Arg Lys Glu Pro Arg Lys Lys Arg

85 90 95

acc ttg gtc cag aag aag tca cag cgt ctc cag aaa ccc tta cgg gtt 336

Thr Leu Val Gln Lys Lys Ser Gln Arg Leu Gln Lys Pro Leu Arg Val

100 105 110

gac ctt gcc ctt gag aat cat tct aag atc cct gct ccc aaa gac atc 384

Asp Leu Ala Leu Glu Asn His Ser Lys Ile Pro Ala Pro Lys Asp Ile

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 | |
| ctc gca cat cag gtc cct aat gcc aag aag ctc agg cga aag gag gag 432 | | | |
| Leu Ala His Gln Val Pro Asn Ala Lys Lys Leu Arg Arg Lys Glu Glu | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| tta tgg gag aaa ctg gca aag cag ggc gaa ctg ccc agg gat gtg cgc 480 | | | |
| Leu Trp Glu Lys Leu Ala Lys Gln Gly Glu Leu Pro Arg Asp Val Arg | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| aag gca cag gcc cga ctc ctt agc cct ccc aca cca aag gcc aaa cct 528 | | | |
| Lys Ala Gln Ala Arg Leu Leu Ser Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Pro | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| ggg ccc cag gac atc att gag cga ccc ttc tat gac ctc tgg aac cca 576 | | | |
| Gly Pro Gln Asp Ile Ile Glu Arg Pro Phe Tyr Asp Leu Trp Asn Pro | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| gac aac cct ctg gac acg cct ttg att ggt cag gat gca ttt ttt ctg 624 | | | |
| Asp Asn Pro Leu Asp Thr Pro Leu Ile Gly Gln Asp Ala Phe Phe Leu | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| gaa cag acc aag aag aaa ggc gtg agg cgg cca caa cgc ctc cac atc 672 | | | |
| Glu Gln Thr Lys Lys Lys Gly Val Arg Arg Pro Gln Arg Leu His Ile | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| aag cct tcc cag gtg cct gca gtg gag gtg att cct gca gga gcc tcc 720 | | | |
| Lys Pro Ser Gln Val Pro Ala Val Glu Val Ile Pro Ala Gly Ala Ser | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |

tac aac cca acc tt

734

Tyr Asn Pro Thr

【 0 3 4 5 】

<210> 8

<211> 1305

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 8

Met Met Glu Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln

1 5 10 15

Asp Asp Tyr Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu

20 25 30

Ala Gly Ser Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp

35 40 45

Glu Glu Val Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu

50 55 60

Asn Leu Asp Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu

65 70 75 80

Glu Leu Leu Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg

85 90 95

Glu Lys Ala Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu

100

105

110

Asp Ala Leu Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His

115

120

125

Tyr Glu Phe Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala

130

135

140

Asp Gln Ile Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu

145

150

155

160

Tyr Asn Ala Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val

165

170

175

Glu His Ile Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln

180

185

190

Thr Glu Ser Ser Leu Pro Gly Arg Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu

195

200

205

Asn Val Phe Pro Leu Ala Asp Gly Met Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser

210

215

220

Glu Ser Gly Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr

225

230

235

240

Lys Ser Asn Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro

245

250

255

Leu Asn Glu Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys

260

265

270

Asn Asn Lys Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val

275

280

285

Gln Val Thr Gln Glu Met Arg Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser

290

295

300

Asp Glu Trp Ser Asp Val Gln Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu

305

310

315

320

Asp Val Cys Pro Glu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr

325

330

335

Gln Gly Ile Val Asn Lys Ala Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr

340

345

350

His Glu Leu Ser Thr Ala Gly Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu

355

360

365

Gly Ala Asp Leu Leu Gly Glu Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly

370

375

380

Met Gly Lys Glu Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu

385

390

395

400

Glu Thr Lys Asn Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys

405

410

415

Val Asp Gln Leu Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu

420

425

430

Ala Ala Lys Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu

435

440

445

Glu Glu Glu Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg

450

455

460

Glu Pro Arg Glu Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu

465

470

475

480

Leu Asp Lys Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu

485

490

495

Met Ala Arg Val Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met

500

505

510

Glu Leu Gln Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg

515

520

525

Glu His Pro Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe

530

535

540

Phe Ser Arg Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg

545

550

555

560

Ser Tyr Pro Ser Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly

565

570

575

Phe Ser Gln Arg Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser

580

585

590

Arg Pro Leu Glu Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg

595

600

605

Arg Glu Gln Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg

610

615

620

Asn Asp Asp Gly Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys

625

630

635

640

Tyr Lys Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys

645

650

655

Asn Val Pro Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro

660

665

670

Ser Thr Lys Leu Trp Cys Ala Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys

675

680

685

Pro His Glu Glu Asp Ser Ser Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg

690

695

700

Asp Pro Leu Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr

705

710

715

720

His Pro Ser Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp

725

730

735

Ala Thr Ser Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser

740

745

750

Lys Val Val Ile Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln

755

760

765

Phe Thr Val Cys Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala

770

775

780

Ala Ser Asp Ser Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp

785

790

795

800

Val Asn Pro Glu Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr

805

810

815

Leu Val Gly Cys Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser

820

825

830

Ser Arg Gly Asp Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala

835

840

845

Thr Thr Ala Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala

850

855

860

Thr Glu Ala Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala
865 870 875 880

Thr Thr Val Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro
885 890 895

Ala Pro Thr Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser
900 905 910

Glu Ser Asn Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu
915 920 925

Leu Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala
930 935 940

Gln Asn Gly Trp Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys
945 950 955 960

Cys Leu His Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His
965 970 975

Val Lys Gly Arg Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile
980 985 990

Phe His Arg Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu
995 1000 1005

Met Asp Leu Gly His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val
1010 1015 1020

Asn Asp Arg Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln
025 1030 1035 1040

Pro Lys Thr Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg
1045 1050 1055

Glu Ser Gln Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val
1060 1065 1070

Ser Ile Arg Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His
1075 1080 1085

Gln His Leu Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu
1090 1095 1100

Gly Thr Gly Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu
1105 1110 1115 1120

Ile Ala Gly Asn Arg Leu Trp Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile
1125 1130 1135

Ser Ile Pro Leu Thr Glu Thr Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu
1140 1145 1150

Gly Leu Arg Ala Asn Lys Thr Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg
1155 1160 1165

Pro Gly Gly Ile Ile His Val Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala

1170

1175

1180

Ala Ser Ser Phe Ile Pro Tyr Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys

185

1190

1195

1200

Phe His Gly His Arg Asp Ala Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly

1205

1210

1215

Asn Val Leu Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu

1220

1225

1230

Gly Pro Gly Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu

1235

1240

1245

Lys Asn Ala Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg

1250

1255

1260

Ile Gly Asp Gly Glu Asp Asp Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val

265

1270

1275

1280

Asn Gln Thr Lys Pro Ser Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile

1285

1290

1295

Val Trp Gln Val Ser Tyr Thr Pro Glu

1300

1305

【0 3 4 6】

<210> 9

<211> 1314

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 9

Met Met Glu Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln

1 5 10 15

Asp Asp Tyr Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu

20 25 30

Ala Gly Ser Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp

35 40 45

Glu Glu Val Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu

50 55 60

Asn Leu Asp Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu

65 70 75 80

Glu Leu Leu Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg

85 90 95

Glu Lys Ala Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu

100 105 110

Asp Ala Leu Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His

115 120 125

Tyr Glu Phe Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala
130 135 140

Asp Gln Ile Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu
145 150 155 160

Tyr Asn Ala Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val
165 170 175

Glu His Ile Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln
180 185 190

Thr Glu Ser Ser Leu Pro Gly Arg Ser Pro Arg Gln Ser Trp Arg Lys
195 200 205

Ser Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu Asn Val Phe Pro Leu Ala Asp
210 215 220

Gly Met Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu Ser Gly Gln Ser Ser Ala
225 230 235 240

Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys Ser Asn Thr Pro Thr Ser
245 250 255

Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Glu Ser Leu Gln Pro
260 265 270

Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn Asn Lys Gln Ala Arg Glu
275 280 285

Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val Gln Val Thr Gln Glu Met Arg

290

295

300

Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser Asp Glu Trp Ser Asp Val Gln

305

310

315

320

Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu Asp Val Cys Pro Glu Thr Arg

325

330

335

Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr Gln Gly Ile Val Asn Lys Ala

340

345

350

Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr His Glu Leu Ser Thr Ala Gly

355

360

365

Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu Gly Ala Asp Leu Leu Gly Glu

370

375

380

Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly Met Gly Lys Glu Val Gly Asn

385

390

395

400

Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu Glu Thr Lys Asn Ala Leu Asn

405

410

415

Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val Asp Gln Leu Ser Gly Glu

420

425

430

Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys Gln Ala Lys Val

| | | |
|---|-----|---------|
| 435 | 440 | 445 |
| Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu Leu Lys Arg Val | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg Glu Glu Val Glu | | |
| 465 | 470 | 475 480 |
| Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys Ile Pro Met Ala | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg Val Leu Met Glu | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln Glu Ala Val Arg | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Val Gln Glu | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe Phe Ser Arg Leu Phe Ser Ser | | |
| 545 | 550 | 555 560 |
| Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg Ser Tyr Pro Ser Val Asn Ile | | |
| 565 | 570 | 575 |
| His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly Phe Ser Gln Arg Arg Ser His | | |
| 580 | 585 | 590 |

Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg Pro Leu Glu Phe Phe Pro
595 600 605

Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg Arg Glu Gln Lys Arg Glu Gln
610 615 620

Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg Asn Asp Asp Gly Arg Leu Gln
625 630 635 640

Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr Lys Gln Leu Ser Pro Asn
645 650 655

Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn Val Pro Val Pro Val Tyr
660 665 670

Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser Thr Lys Leu Trp Cys Ala
675 680 685

Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro His Glu Glu Asp Ser Ser
690 695 700

Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp Pro Leu Thr Cys Asp Arg
705 710 715 720

Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr His Pro Ser Pro Glu Lys Lys
725 730 735

Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala Thr Ser Ser Arg Val Trp
740 745 750

Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys Val Val Ile Ile Asp Ala

755

760

765

Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe Thr Val Cys Asn Ala His

770

775

780

Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala Ser Asp Ser Asp Tyr Pro

785

790

795

800

Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp Val Asn Pro Glu Asp Ser Gly

805

810

815

Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu Val Gly Cys Ala Thr Arg

820

825

830

Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser Arg Gly Asp Thr Pro Val

835

840

845

Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr Thr Ala Asn Gly Lys Val

850

855

860

Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr Glu Ala Thr Glu Val Pro

865

870

875

880

Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr Thr Val Arg Pro Gly Pro

885

890

895

Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro Ala Pro Thr Pro Ser Ser Ser

900

905

910

Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu Ser Asn Gly Thr Ile Val

915

920

925

Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu Ser Thr Thr Thr Ser Ser

930

935

940

Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly Trp Leu Tyr Val

945

950

955

960

His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys Leu His Ser Ile Lys Leu

965

970

975

Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His Val Lys Gly Arg Val Leu Val

980

985

990

Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg Gly Glu Asp Gly

995

1000

1005

Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Met Asp Leu Gly His Pro His

1010

1015

1020

His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val Asn Asp Arg Val Trp Cys Gly

1025

1030

1035

1040

Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln Pro Lys Thr Met Gln Ile Glu

1045

1050

1055

Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg Glu Ser Gln Val Arg Gln Leu
1060 1065 1070

Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val Ser Ile Arg Leu Asp Ser Thr
1075 1080 1085

Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His Gln His Leu Gln Asp Val Asp
1090 1095 1100

Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Gly Phe
1105 1110 1115 1120

Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile Ala Gly Asn Arg Leu Trp
1125 1130 1135

Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile Ser Ile Pro Leu Thr Glu Thr
1140 1145 1150

Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu Gly Leu Arg Ala Asn Lys Thr
1155 1160 1165

Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg Pro Gly Gly Ile Ile His Val
1170 1175 1180

Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala Ala Ser Ser Phe Ile Pro Tyr
1185 1190 1195 1200

Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys Phe His Gly His Arg Asp Ala
1205 1210 1215

Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu Ala Thr Leu Asn

1220

1225

1230

Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly Pro Gly Pro Ala Ala Pro

1235

1240

1245

Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys Asn Ala Leu Val Leu Ser

1250

1255

1260

Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile Gly Asp Gly Glu Asp Asp

265

1270

1275

1280

Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn Gln Thr Lys Pro Ser Leu

1285

1290

1295

Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile Val Trp Gln Val Ser Tyr Thr

1300

1305

1310

Pro Glu

【0 3 4 7】

<210> 10

<211> 1337

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 10

Met Met Glu Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln

1 5 10 15

Asp Asp Tyr Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu

20 25 30

Ala Gly Ser Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp

35 40 45

Glu Glu Val Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu

50 55 60

Asn Leu Asp Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu

65 70 75 80

Glu Leu Leu Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg

85 90 95

Glu Lys Ala Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu

100 105 110

Asp Ala Leu Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His

115 120 125

Tyr Glu Phe Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala

130 135 140

Asp Gln Ile Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu

145 150 155 160

Tyr Asn Ala Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val

165 170 175

Glu His Ile Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln

180 185 190

Thr Glu Ser Ser Leu Pro Gly Arg Ser Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser

195 200 205

Leu Asn Val Phe Pro Leu Ala Asp Gly Met Val Arg Ala Gln Met Gly

210 215 220

Gly Lys Leu Val Pro Ala Gly Asp His Trp His Leu Ser Asp Leu Gly

225 230 235 240

Gln Leu Gln Ser Ser Ser Ser Tyr Gln Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser

245 250 255

Glu Ser Gly Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr

260 265 270

Lys Ser Asn Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro

275 280 285

Leu Asn Glu Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys

290 295 300

Asn Asn Lys Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val
305 310 315 320

Gln Val Thr Gln Glu Met Arg Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser
325 330 335

Asp Glu Trp Ser Asp Val Gln Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu
340 345 350

Asp Val Cys Pro Glu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr
355 360 365

Gln Gly Ile Val Asn Lys Ala Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr
370 375 380

His Glu Leu Ser Thr Ala Gly Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu
385 390 395 400

Gly Ala Asp Leu Leu Gly Glu Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly
405 410 415

Met Gly Lys Glu Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu
420 425 430

Glu Thr Lys Asn Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys
435 440 445

Val Asp Gln Leu Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu
450 455 460

Ala Ala Lys Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu
465 470 475 480

Glu Glu Glu Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg
485 490 495

Glu Pro Arg Glu Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu
500 505 510

Leu Asp Lys Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu
515 520 525

Met Ala Arg Val Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met
530 535 540

Glu Leu Gln Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg
545 550 555 560

Glu His Pro Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe
565 570 575

Phe Ser Arg Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg
580 585 590

Ser Tyr Pro Ser Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly
595 600 605

Phe Ser Gln Arg Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser

610

615

620

Arg Pro Leu Glu Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg

625

630

635

640

Arg Glu Gln Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg

645

650

655

Asn Asp Asp Gly Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys

660

665

670

Tyr Lys Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys

675

680

685

Asn Val Pro Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro

690

695

700

Ser Thr Lys Leu Trp Cys Ala Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys

705

710

715

720

Pro His Glu Glu Asp Ser Ser Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg

725

730

735

Asp Pro Leu Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr

740

745

750

His Pro Ser Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp

755

760

765

Ala Thr Ser Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser
770 775 780

Lys Val Val Ile Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln
785 790 795 800

Phe Thr Val Cys Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala
805 810 815

Ala Ser Asp Ser Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp
820 825 830

Val Asn Pro Glu Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr
835 840 845

Leu Val Gly Cys Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser
850 855 860

Ser Arg Gly Asp Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala
865 870 875 880

Thr Thr Ala Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala
885 890 895

Thr Glu Ala Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala
900 905 910

Thr Thr Val Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro
915 920 925

Ala Pro Thr Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser

930

935

940

Glu Ser Asn Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu

945

950

955

960

Leu Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala

965

970

975

Gln Asn Gly Trp Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys

980

985

990

Cys Leu His Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His

995

1000

1005

Val Lys Gly Arg Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile

1010

1015

1020

Phe His Arg Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu

1025

1030

1035

1040

Met Asp Leu Gly His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val

1045

1050

1055

Asn Asp Arg Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln

1060

1065

1070

Pro Lys Thr Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg

| | | |
|---|------|------|
| 1075 | 1080 | 1085 |
| Glu Ser Gln Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val | | |
| 1090 | 1095 | 1100 |
| Ser Ile Arg Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His | | |
| 105 | 1110 | 1115 |
| Gln His Leu Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu | | |
| 1125 | 1130 | 1135 |
| Gly Thr Gly Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu | | |
| 1140 | 1145 | 1150 |
| Ile Ala Gly Asn Arg Leu Trp Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile | | |
| 1155 | 1160 | 1165 |
| Ser Ile Pro Leu Thr Glu Thr Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu | | |
| 1170 | 1175 | 1180 |
| Gly Leu Arg Ala Asn Lys Thr Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg | | |
| 185 | 1190 | 1195 |
| Pro Gly Gly Ile Ile His Val Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala | | |
| 1205 | 1210 | 1215 |
| Ala Ser Ser Phe Ile Pro Tyr Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys | | |
| 1220 | 1225 | 1230 |

Phe His Gly His Arg Asp Ala Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly

1235

1240

1245

Asn Val Leu Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu

1250

1255

1260

Gly Pro Gly Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu

265

1270

1275

1280

Lys Asn Ala Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg

1285

1290

1295

Ile Gly Asp Gly Glu Asp Asp Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val

1300

1305

1310

Asn Gln Thr Lys Pro Ser Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile

1315

1320

1325

Val Trp Gln Val Ser Tyr Thr Pro Glu

1330

1335

【 0 3 4 8 】

<210> 11

<211> 1336

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 11

Met Met Glu Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln

1 5 10 15

Asp Asp Tyr Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu

20 25 30

Ala Gly Ser Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp

35 40 45

Glu Glu Val Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu

50 55 60

Asn Leu Asp Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu

65 70 75 80

Glu Leu Leu Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg

85 90 95

Glu Lys Ala Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu

100 105 110

Asp Ala Leu Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His

115 120 125

Tyr Glu Phe Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala

130 135 140

Asp Gln Ile Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu

145 150 155 160

Tyr Asn Ala Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val

165

170

175

Glu His Ile Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln

180

185

190

Thr Glu Ser Ser Leu Pro Gly Arg Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu

195

200

205

Asn Val Phe Pro Leu Ala Asp Gly Met Val Arg Ala Gln Met Gly Gly

210

215

220

Lys Leu Val Pro Ala Gly Asp His Trp His Leu Ser Asp Leu Gly Gln

225

230

235

240

Leu Gln Ser Ser Ser Ser Tyr Gln Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu

245

250

255

Ser Gly Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys

260

265

270

Ser Asn Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu

275

280

285

Asn Glu Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn

290

295

300

Asn Lys Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val Gln

305 310 315 320

Val Thr Gln Glu Met Arg Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser Asp

325 330 335

Glu Trp Ser Asp Val Gln Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu Asp

340 345 350

Val Cys Pro Glu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr Gln

355 360 365

Gly Ile Val Asn Lys Ala Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr His

370 375 380

Glu Leu Ser Thr Ala Gly Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu Gly

385 390 395 400

Ala Asp Leu Leu Gly Glu Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly Met

405 410 415

Gly Lys Glu Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu Glu

420 425 430

Thr Lys Asn Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val

435 440 445

Asp Gln Leu Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala

450 455 460

Ala Lys Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu
465 470 475 480

Glu Glu Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu
485 490 495

Pro Arg Glu Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu
500 505 510

Asp Lys Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu Met
515 520 525

Ala Arg Val Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu
530 535 540

Leu Gln Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu
545 550 555 560

His Pro Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe Phe
565 570 575

Ser Arg Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg Ser
580 585 590

Tyr Pro Ser Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly Phe
595 600 605

Ser Gln Arg Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg
610 615 620

Pro Leu Glu Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg Arg
625 630 635 640

Glu Gln Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg Asn
645 650 655

Asp Asp Gly Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr
660 665 670

Lys Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn
675 680 685

Val Pro Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser
690 695 700

Thr Lys Leu Trp Cys Ala Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro
705 710 715 720

His Glu Glu Asp Ser Ser Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp
725 730 735

Pro Leu Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr His
740 745 750

Pro Ser Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala
755 760 765

Thr Ser Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys

770

775

780

Val Val Ile Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe

785

790

795

800

Thr Val Cys Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala

805

810

815

Ser Asp Ser Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp Val

820

825

830

Asn Pro Glu Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu

835

840

845

Val Gly Cys Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser

850

855

860

Arg Gly Asp Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr

865

870

875

880

Thr Ala Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr

885

890

895

Glu Ala Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr

900

905

910

Thr Val Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro Ala

915

920

925

Pro Thr Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu
930 935 940

Ser Asn Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu
945 950 955 960

Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln
965 970 975

Asn Gly Trp Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys
980 985 990

Leu His Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His Val
995 1000 1005

Lys Gly Arg Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe
1010 1015 1020

His Arg Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Met
1025 1030 1035 1040

Asp Leu Gly His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val Asn
1045 1050 1055

Asp Arg Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln Pro
1060 1065 1070

Lys Thr Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg Glu
1075 1080 1085

Ser Gln Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val Ser

1090

1095

1100

Ile Arg Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His Gln

105

1110

1115

1120

His Leu Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly

1125

1130

1135

Thr Gly Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile

1140

1145

1150

Ala Gly Asn Arg Leu Trp Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile Ser

1155

1160

1165

Ile Pro Leu Thr Glu Thr Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu Gly

1170

1175

1180

Leu Arg Ala Asn Lys Thr Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg Pro

185

1190

1195

1200

Gly Gly Ile Ile His Val Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala Ala

1205

1210

1215

Ser Ser Phe Ile Pro Tyr Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys Phe

1220

1225

1230

His Gly His Arg Asp Ala Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly Asn

1235

1240

1245

Val Leu Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly

1250

1255

1260

Pro Gly Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys

265

1270

1275

1280

Asn Ala Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile

1285

1290

1295

Gly Asp Gly Glu Asp Asp Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn

1300

1305

1310

Gln Thr Lys Pro Ser Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile Val

1315

1320

1325

Trp Gln Val Ser Tyr Thr Pro Glu

1330

1335

【0 3 4 9】

<210> 12

<211> 430

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 12

Met Ser Gly Val Arg Pro Pro Ile Met Asn Gly Pro Met His Pro Arg

1

5

10

15

Pro Leu Val Ala Leu Leu Asp Gly Arg Asp Cys Thr Val Glu Met Pro

20

25

30

Ile Leu Lys Asp Val Ala Thr Val Ala Phe Cys Asp Ala Gln Ser Thr

35

40

45

Gln Glu Ile His Glu Lys Val Leu Asn Glu Ala Val Gly Ala Leu Met

50

55

60

Tyr His Thr Ile Thr Leu Thr Arg Glu Asp Leu Glu Lys Phe Lys Ala

65

70

75

80

Leu Arg Ile Ile Val Arg Ile Gly Ser Gly Phe Asp Asn Ile Asp Ile

85

90

95

Lys Ser Ala Gly Asp Leu Gly Ile Ala Val Cys Asn Val Pro Ala Ala

100

105

110

Ser Val Glu Glu Thr Ala Asp Ser Thr Leu Cys His Ile Leu Asn Leu

115

120

125

Tyr Arg Arg Thr Thr Trp Leu His Gln Ala Leu Arg Glu Gly Thr Arg

130

135

140

Val Gln Ser Val Glu Gln Ile Arg Glu Val Ala Ser Gly Ala Ala Arg

145

150

155

160

Ile Arg Gly Glu Thr Leu Gly Ile Ile Gly Leu Gly Arg Val Gly Gln

165

170

175

Ala Val Ala Leu Arg Ala Lys Ala Phe Gly Phe Asn Val Leu Phe Tyr

180

185

190

Asp Pro Tyr Leu Ser Asp Gly Ile Glu Arg Ala Leu Gly Leu Gln Arg

195

200

205

Val Ser Thr Leu Gln Asp Leu Leu Phe His Ser Asp Cys Val Thr Leu

210

215

220

His Cys Gly Leu Asn Glu His Asn His His Leu Ile Asn Asp Phe Thr

225

230

235

240

Val Lys Gln Met Arg Gln Gly Ala Phe Leu Val Asn Thr Ala Arg Gly

245

250

255

Gly Leu Val Asp Glu Lys Ala Val Ala Gln Ala Leu Lys Glu Gly Arg

260

265

270

Ile Arg Gly Ala Ala Leu Asp Val His Glu Ser Glu Pro Phe Ser Phe

275

280

285

Ser Gln Gly Pro Leu Lys Asp Ala Pro Asn Leu Ile Cys Thr Pro His

290

295

300

Ala Ala Trp Tyr Ser Glu Gln Ala Ser Ile Glu Met Arg Glu Glu Ala

305

310

315

320

Ala Arg Glu Ile Arg Arg Ala Ile Thr Gly Arg Ile Pro Asp Ser Leu

325

330

335

Lys Asn Cys Val Asn Lys Asp His Leu Thr Ala Ala Thr His Trp Ala

340

345

350

Ser Met Asp Pro Ala Val Val His Pro Glu Leu Asn Gly Ala Ala Tyr

355

360

365

Ser Arg Tyr Pro Pro Gly Val Val Ser Val Ala Pro Thr Gly Ile Pro

370

375

380

Ala Ala Val Glu Gly Ile Val Pro Ser Ala Met Ser Leu Ser His Gly

385

390

395

400

Leu Pro Pro Val Ala His Pro Pro His Ala Pro Ser Pro Gly Gln Thr

405

410

415

Val Lys Pro Glu Ala Asp Arg Asp His Thr Ser Asp Gln Leu

420

425

430

【 0 3 5 0 】

<210> 13

<211> 1508

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 13

Met Met Ala Gly Glu Gly Ser Thr Ile Thr Ser Arg Ile Lys Asn Leu

1 5 10 15

Leu Arg Ser Pro Ser Ile Lys Leu Arg Arg Ser Lys Ala Gly Asn Arg

20 25 30

Arg Glu Asp Leu Ser Ser Lys Val Thr Leu Glu Lys Val Leu Gly Val

35 40 45

Thr Val Ser Gly Gly Arg Gly Leu Ala Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu

50 55 60

Val Ala Tyr Pro Ala Gly Cys Val Val Val Leu Phe Asn Pro Arg Lys

65 70 75 80

His Lys Gln His His Ile Leu Asn Ser Ser Arg Lys Thr Ile Thr Ala

85 90 95

Leu Ala Phe Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Leu Val Thr Gly Glu Ser Gly

100 105 110

His Met Pro Ala Val Arg Val Trp Asp Val Ala Glu Arg Ser Gln Val

115 120 125

Ala Glu Leu Gln Glu His Lys Tyr Gly Val Ala Cys Val Ala Phe Ser

130 135 140

Pro Ser Ala Lys Tyr Ile Val Ser Val Gly Tyr Gln His Asp Met Ile

145 150 155 160

Val Asn Val Trp Ala Trp Lys Lys Asn Ile Val Val Ala Ser Asn Lys

165 170 175

Val Ser Ser Arg Val Thr Ala Val Ser Phe Ser Glu Asp Cys Ser Tyr

180 185 190

Phe Val Thr Ala Gly Asn Arg His Ile Lys Phe Trp Tyr Leu Asp Asp

195 200 205

Ser Lys Thr Ser Lys Val Asn Ala Thr Val Pro Leu Leu Gly Arg Ser

210 215 220

Gly Leu Leu Gly Glu Leu Arg Asn Asn Leu Phe Thr Asp Val Ala Cys

225 230 235 240

Gly Arg Gly Glu Lys Ala Asp Ser Thr Phe Cys Ile Thr Ser Ser Gly

245 250 255

Leu Leu Cys Glu Phe Ser Asp Arg Arg Leu Leu Asp Lys Trp Val Glu

260 265 270

Leu Arg Asn Thr Asp Ser Phe Thr Thr Thr Val Ala His Cys Ile Ser

275 280 285

Val Thr Gln Glu Tyr Ile Phe Cys Gly Cys Ala Asp Gly Thr Val Arg

290 295 300

Leu Phe Asn Pro Ser Asn Leu His Phe Leu Ser Thr Leu Pro Arg Pro
305 310 315 320

His Ala Leu Gly Thr Asp Ile Ala Ser Ile Thr Glu Ala Ser Arg Leu
325 330 335

Phe Ser Gly Gly Val Asn Ala Arg Tyr Pro Asp Thr Ile Ala Leu Thr
340 345 350

Phe Asp Pro Thr Asn Gln Trp Leu Ser Cys Val Tyr Asn Asp His Ser
355 360 365

Ile Tyr Val Trp Asp Val Arg Asp Pro Lys Lys Val Gly Lys Val Tyr
370 375 380

Ser Ala Leu Tyr His Ser Ser Cys Val Trp Ser Val Glu Val Tyr Pro
385 390 395 400

Glu Ile Lys Asp Ser His Gln Ala Cys Leu Pro Leu Ser Ser Phe Ile
405 410 415

Thr Cys Ser Ser Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asn Thr Glu Ser Ser
420 425 430

Gly Val His Gly Ser Thr Leu His Arg Asn Ile Leu Ser Asn Asp Leu
435 440 445

Ile Lys Ile Ile Tyr Val Asp Gly Asn Thr Gln Ala Leu Leu Asp Thr
450 455 460

Glu Leu Pro Gly Gly Asp Lys Ala Asp Gly Ser Leu Met Asp Pro Arg
465 470 475 480

Val Gly Ile Arg Ser Val Cys Ile Ser Pro Asn Gly Gln His Leu Ala
485 490 495

Ser Gly Asp Arg Met Gly Thr Leu Arg Ile His Glu Leu Gln Ser Leu
500 505 510

Ser Glu Met Leu Lys Val Glu Ala His Asp Ser Glu Ile Leu Cys Leu
515 520 525

Glu Tyr Ser Lys Pro Asp Thr Gly Leu Lys Leu Leu Ala Ser Ala Ser
530 535 540

Arg Asp Arg Leu Ile His Glu Leu Asp Ala Gly Arg Glu Tyr Ser Leu
545 550 555 560

Gln Gln Thr Leu Asp Glu His Ser Ser Ser Ile Thr Ala Val Lys Phe
565 570 575

Ala Ala Ser Asp Gly Gln Val Arg Met Ile Ser Cys Gly Ala Asp Lys
580 585 590

Ser Ile Tyr Phe Arg Thr Ala Gln Lys Ser Gly Glu Gly Val Gln Phe
595 600 605

Thr Arg Thr His His Val Val Arg Lys Thr Thr Leu Tyr Asp Met Asp

610

615

620

Val Glu Pro Ser Trp Lys Tyr Thr Ala Ile Gly Cys Gln Asp Arg Asn

625

630

635

640

Ile Arg Ile Phe Asn Ile Ser Ser Gly Lys Gln Lys Lys Leu Phe Lys

645

650

655

Gly Ser Gln Gly Glu Asp Gly Thr Leu Ile Lys Val Gln Thr Asp Pro

660

665

670

Ser Gly Ile Tyr Ile Ala Thr Ser Cys Ser Asp Lys Asn Leu Ser Ile

675

680

685

Phe Asp Phe Ser Ser Gly Glu Cys Val Ala Thr Met Phe Gly His Ser

690

695

700

Glu Ile Val Thr Gly Met Lys Phe Ser Asn Asp Cys Lys His Leu Ile

705

710

715

720

Ser Val Ser Gly Asp Ser Cys Ile Phe Val Trp Arg Leu Ser Ser Glu

725

730

735

Met Thr Ile Ser Met Arg Gln Arg Leu Arg Glu Arg Arg Gln Arg Gln

740

745

750

Arg Gly Ile Lys Gln Gln Gly Pro Thr Ser Pro Gln Arg Ala Ser Gly

755

760

765

Ala Lys Gln His His Ala Pro Val Val Pro Pro Ser Gly Pro Ala Leu
770 775 780

Ser Ser Asp Ser Asp Lys Glu Gly Glu Asp Glu Gly Thr Glu Glu Glu
785 790 795 800

Glu Leu Pro Ala Leu Pro Ile Leu Ser Lys Ser Thr Lys Lys Glu Leu
805 810 815

Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Leu Leu Arg Ser Leu Ser His Trp Glu
820 825 830

Met Ser Arg Ala Gln Glu Thr Met Glu Tyr Leu Asp Pro Ala Pro Val
835 840 845

Ala Asn Thr Gly Pro Lys Arg Arg Gly Arg Trp Ala Gln Pro Gly Val
850 855 860

Glu Leu Ser Val Arg Ser Met Leu Asp Leu Arg Gln Ile Glu Thr Leu
865 870 875 880

Ala Pro Ser Pro Arg Gly Pro Ser Gln Asp Ser Leu Ala Val Ser Pro
885 890 895

Ala Gly Pro Gly Lys His Gly Pro Gln Ala Pro Glu Leu Ser Cys Val
900 905 910

Ser Gln Asn Glu Arg Ala Pro Arg Leu Gln Thr Ser Gln Pro Cys Ser
915 920 925

Cys Pro Asp Ile Ile Gln Leu Leu Ser Gln Glu Glu Gly Val Phe Ala
930 935 940

Gln Asp Leu Glu Pro Ala Pro Ile Glu Asp Gly Ile Val Tyr Pro Glu
945 950 955 960

Pro Ser Asp Ser Pro Thr Met Asp Thr Ser Ala Phe Gln Val Gln Ala
965 970 975

Pro Thr Gly Gly Ser Leu Gly Arg Met Tyr Pro Gly Ser Arg Gly Ser
980 985 990

Glu Lys His Ser Pro Asp Ser Ala Cys Ser Val Asp Tyr Ser Ser Ser
995 1000 1005

Arg Leu Ser Ser Pro Glu His Pro Asn Glu Asp Ser Glu Ser Thr Glu
1010 1015 1020

Pro Leu Ser Val Asp Gly Ile Ser Ser Asp Leu Glu Glu Pro Ala Glu
1025 1030 1035 1040

Gly Asp Glu Asp Glu Glu Glu Gly Gly Thr Gly Leu Cys Gly Leu
1045 1050 1055

Gln Glu Gly Gly Pro Arg Thr Pro Asp Gln Glu Gln Phe Leu Lys Gln
1060 1065 1070

Leu Phe Glu Thr Leu Ala Asn Gly Thr Ala Pro Gly Gly Pro Ala Arg

| | | |
|---|------|-----------|
| 1075 | 1080 | 1085 |
| Val Leu Glu Arg Thr Glu Ser Arg Ser Ile Ser Ser Arg Phe Leu Leu | | |
| 1090 | 1095 | 1100 |
| Gln Val Gln Thr Leu Pro Leu Arg Glu Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gly | | |
| 105 | 1110 | 1115 1120 |
| Leu Ala Leu Thr Ser Arg Pro Asp Gln Val Ser Gln Val Ser Gly Glu | | |
| 1125 | 1130 | 1135 |
| Gln Leu Lys Gly Ser Gly Ala Thr Pro Pro Gly Ala Pro Pro Glu Met | | |
| 1140 | 1145 | 1150 |
| Glu Pro Ser Ser Gly Asn Ser Gly Pro Lys Gln Val Ala Pro Val Leu | | |
| 1155 | 1160 | 1165 |
| Leu Thr Arg Arg Arg Asn Asn Leu Asp Asn Ser Trp Ala Ser Lys Lys | | |
| 1170 | 1175 | 1180 |
| Met Ala Ala Thr Arg Pro Leu Ala Gly Leu Gln Lys Ala Gln Ser Val | | |
| 185 | 1190 | 1195 1200 |
| His Ser Leu Val Pro Gln Asp Glu Val Pro Ser Ser Arg Pro Leu Leu | | |
| 1205 | 1210 | 1215 |
| Phe Arg Glu Ala Glu Thr Gln Gly Ser Leu Gly Ser Leu Pro Gln Ala | | |
| 1220 | 1225 | 1230 |

Gly Gly Cys Ser Ser Gln Pro His Ser Tyr Gln Asn His Thr Thr Ser
1235 1240 1245

Ser Met Ala Lys Leu Ala Arg Ser Ile Ser Val Gly Glu Asn Pro Gly
1250 1255 1260

Leu Ala Thr Glu Pro Gln Ala Pro Ala Pro Ile Arg Ile Ser Pro Phe
1265 1270 1275 1280

Asn Lys Leu Ala Leu Pro Ser Arg Ala His Leu Val Leu Asp Ile Pro
1285 1290 1295

Lys Pro Leu Pro Asp Arg Pro Thr Leu Thr Thr Phe Ser Pro Val Ser
1300 1305 1310

Lys Gly Leu Thr His Asn Glu Thr Glu Gln Ser Gly Pro Leu Arg Glu
1315 1320 1325

Pro Arg Lys Ala His Thr Thr Val Glu Lys His Ser Cys Leu Gly Glu
1330 1335 1340

Gly Thr Thr His Lys Ser Arg Thr Glu Cys Gln Ala Tyr Pro Gly Pro
1345 1350 1355 1360

Asn His Pro Cys Arg Gln Gln Leu Pro Val Asn Asn Leu Leu Gln Ala
1365 1370 1375

Glu Ser Leu Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Thr Arg Asn Pro Val Glu
1380 1385 1390

Ser Ser Arg Pro Gly Val Ala Leu Ser Gln Asp Ser Glu Leu Ala Leu

1395

1400

1405

Ser Leu Gln Gln Cys Glu Gln Leu Val Ala Glu Leu Gln Gly Asn Val

1410

1415

1420

Arg Gln Ala Val Glu Leu Tyr Arg Ala Val Thr Ser Cys Lys Thr Pro

425

1430

1435

1440

Ser Ala Glu Gln Ser His Ile Thr Arg Leu Leu Arg Asp Thr Phe Ser

1445

1450

1455

Pro Val Arg Gln Glu Leu Glu Val Leu Ala Gly Ala Val Leu Ser Ser

1460

1465

1470

Pro Gly Gly Ser Pro Gly Ala Val Ala Ala Glu Gln Thr Gln Ala Leu

1475

1480

1485

Leu Glu Gln Tyr Ser Glu Leu Leu Leu Arg Ala Val Glu Arg Arg Met

1490

1495

1500

Glu Arg Arg Leu

505

【0 3 5 1】

<210> 14

<211> 244

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 14

Ser Ser Lys Tyr Ser Asn Glu Ser Arg Ser Gln Ala Asp Ser Gly Phe

1

5

10

15

Leu Gly Leu Arg Pro Thr Ser Val Asp Pro Ala Leu Arg Arg Arg Arg

20

25

30

Arg Gly Pro Arg Asn Lys Lys Arg Gly Trp Arg Arg Leu Ala Glu Glu

35

40

45

Pro Leu Gly Leu Glu Val Asp Gln Phe Leu Glu Asp Val Arg Leu Gln

50

55

60

Glu Arg Thr Thr Gly Gly Leu Leu Ala Glu Ala Pro Asn Glu Lys Leu

65

70

75

80

Phe Phe Val Asp Thr Gly Phe Lys Arg Lys Glu Pro Arg Lys Lys Arg

85

90

95

Thr Leu Val Gln Lys Lys Ser Gln Arg Leu Gln Lys Pro Leu Arg Val

100

105

110

Asp Leu Ala Leu Glu Asn His Ser Lys Ile Pro Ala Pro Lys Asp Ile

115

120

125

Leu Ala His Gln Val Pro Asn Ala Lys Lys Leu Arg Arg Lys Glu Glu

130

135

140

Leu Trp Glu Lys Leu Ala Lys Gln Gly Glu Leu Pro Arg Asp Val Arg

145

150

155

160

Lys Ala Gln Ala Arg Leu Leu Ser Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Pro

165

170

175

Gly Pro Gln Asp Ile Ile Glu Arg Pro Phe Tyr Asp Leu Trp Asn Pro

180

185

190

Asp Asn Pro Leu Asp Thr Pro Leu Ile Gly Gln Asp Ala Phe Phe Leu

195

200

205

Glu Gln Thr Lys Lys Lys Gly Val Arg Arg Pro Gln Arg Leu His Ile

210

215

220

Lys Pro Ser Gln Val Pro Ala Val Glu Val Ile Pro Ala Gly Ala Ser

225

230

235

240

Tyr Asn Pro Thr

【 0 3 5 2 】

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 15

tagatatcgc cttggaacaa gagaaga

27

【 0 3 5 3 】

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 16

atgaattctc agttgttctt tgtgacactg a

31

【図面の簡単な説明】

【図 1】 p c DNA 3-S-J S A P 1 a ~ p c DNA 3-S-J S A P 1 d の制限酵素地図を示した図である。

【図 2】 p c DNA 3-S-J S A P 3 の制限酵素地図を示した図である。

【図 3】 p c DNA 3-S-J S A P 4 および p G A D 1 0-J S A P 5 の制限酵素地図を示した図である。

【図 4】 マウス J N K 3、マウス J S A P 1 a の各 c DNA の一部の配列をプローブとしてマウス肝臓、脾臓、腎臓、脳、心臓、肺、精巢の m R N A に対してノーザンハイブリダイゼーションを行った結果を示した電気泳動の図である。発現コントロールとして β -a c t i n の結果も合わせて示した。

【図5】 JNK1、JNK2、JNK3、ERK2、p38に対するJSAP1aの結合性をウエスタンブローディングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。下段はCOS-7細胞における各Flag-JNK1、2、3、ERK2、p38の発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローディングの結果を示している。

【図6】 JSAP1aにおけるJNK3結合領域の解析結果を示した電気泳動の図である。図である。

【図7】 JNK3によるJSAP1aのリン酸化を解析結果を示した電気泳動の図である。図である。

【図8】 JSAP1aのリン酸化と、JNK3の細胞内局在性を解析した結果を示した図である。JNK3は抗体染色により検出した。細胞の核はHoechst染色により検出した。

【図9】 SEK1に対するJSAP1aの結合性をウエスタンブローディングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。下の2段はCOS-7細胞における各Flag-SEK1、および活性化SEK1の発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローディングの結果を示している。FLは全長ポリペプチドを意味する。

【図10】 MKK7に対するJSAP1aの結合性をウエスタンブローディングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。下段はCOS-7細胞における各Flag-MKK7の発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローディングの結果を示している。FLは全長ポリペプチドを意味する。

【図11】 MEK1、MKK6に対するJSAP1aの結合性をウエスタンブローディングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。下段はCOS-7細胞における各Flag-MEK1、MKK6の発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローディングの結果を示している。FLは全長ポリペプチドを意味する。

【図12】 MEKK1のN末端部分(1-640アミノ酸残基)に対するJSAP1aの結合性をウエスタンブローディングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。下段はCOS-7細胞における各Flag-MEKK1のN末端

部分の発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローティングの結果を示している。FLは全長ポリペプチドを意味する。

【図13】 c-Raf1のN末端部分（1-327アミノ酸残基）あるいはC末端部分（316-648アミノ酸残基）に対するJSAP1aの結合性をウエスタンブローティングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。下段はCOS-7細胞における各Flag-Raf-N、Raf-Cの発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローティングの結果を示している。FLは全長ポリペプチドを意味する。

【図14】 P19細胞におけるJNK3活性をGAL4-c-Jun転写活性として測定するLUCレポーター系で、JNK3活性に対するCdc42およびJSAP1aの効果を調べた結果を示す図である。縦軸はJNK3活性に対応する、相対的なルシフェラーゼ活性を示した。

【図15】 P19細胞におけるERK活性をGAL4-E1k1転写活性として測定するLUCレポーター系で、ERK活性に対するΔRaf1およびJSAP1aの効果を調べた結果を示す図である。縦軸はERK活性に対応する、相対的なルシフェラーゼ活性を示した。。

【図16】 COS-7細胞にΔMEKK1、JNK3遺伝子を単独あるいは両方をいっしょに導入し、得られたΔMEKK1酵素液、JNK3酵素液、活性化JNK3酵素液を用い、ウエスタンブローティングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。Aは、活性化JNK3の発現をリン酸化型JNK3を認識する抗体で染色した結果を、Bは抗Flag抗体でJNK3を染色した結果を示す。レーン1にはΔMEKK1酵素液、レーン2には活性化JNK3酵素液、レーン3にはJNK3酵素液、レーン4には遺伝子を導入しないCOS-7細胞破碎液を泳動した。

【図17】 JNK3に対するJSAP3、4、5の結合性をウエスタンブローティングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。下段はCOS-7細胞における各Flag-JNK3の発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローティングの結果を示している。

【図18】 ATF2に対するJSAP3の結合性をオートラジオグラフィーに

より解析した結果を示した電気泳動の図である。

【図 19】 ^{35}S でラベルされた種々の長さを有する JSAP4 分子の発現をオートラジオグラフィーにより解析した結果を示した電気泳動の図である。

【図 20】 JSAP4 の JNK3 結合領域をオートラジオグラフィーにより解析により解析した結果を示した電気泳動の図である。得られた ^{35}S でラベルされた種々の長さを有する JSAP4 分子と、GST あるいは GST-JNK3 との結合を解析した結果であり、結合した場合にそれがバンドとして観測される。

【図 21】 JSAP4 の JNK1、JNK2、ERK2 への結合性をウエスタンブローディングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。3 段のブローディングのうち、第 2 段および第 3 段はそれぞれ COS-7 細胞における JSAP4 および各 MAPK (JNK1、JNK2、JNK3、ERK2) の発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローディングの結果を示している。

【図 22】 JSAP4 の cDNA の一部の配列をプローブとしてマウス精巣、大腸、心臓、肺、腎臓、脳、脾臓、肝臓の mRNA に対してノーザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す。発現コントロールとして β -actin の結果も合わせて示した。

【図 23】 COS-7 細胞における JNK 活性を GAL4-c-Jun 転写活性として測定する LUC レポーター系で、JNK 活性に対する MEKK1、TAK1 および JSAP4 の効果を調べた結果を示す図である。縦軸は JNK 活性に対応する、相対的なルシフェラーゼ活性を示した。

【図 24】 COS-7 細胞における ERK 活性を GAL4-Erk1 転写活性として測定する LUC レポーター系で、ERK 活性に対する Δ Raf1 および JSAP4 の効果を調べた結果を示す図である。縦軸は ERK 活性に対応する、相対的なルシフェラーゼ活性を示した。

【符号の説明】

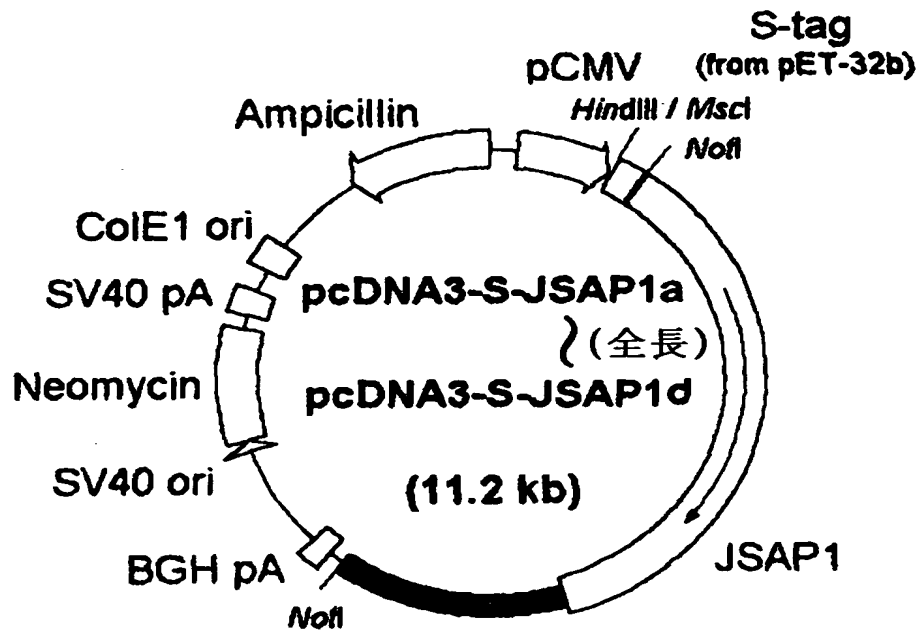
kb: キロ塩基対 (kilobase pairs)

Ap: アンピシリン耐性遺伝子

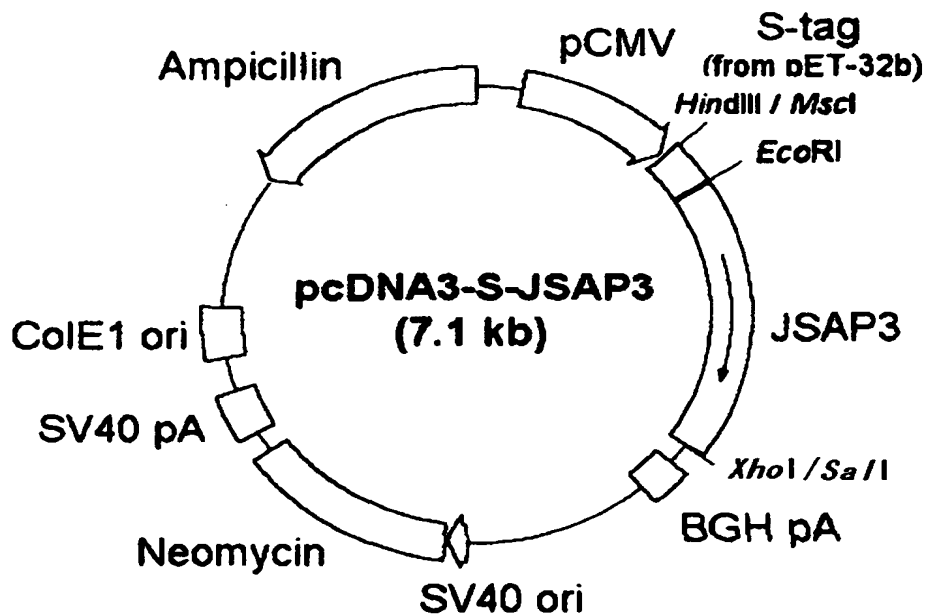
knt: キロヌクレオチド (kilonucleotides)

【書類名】 図面

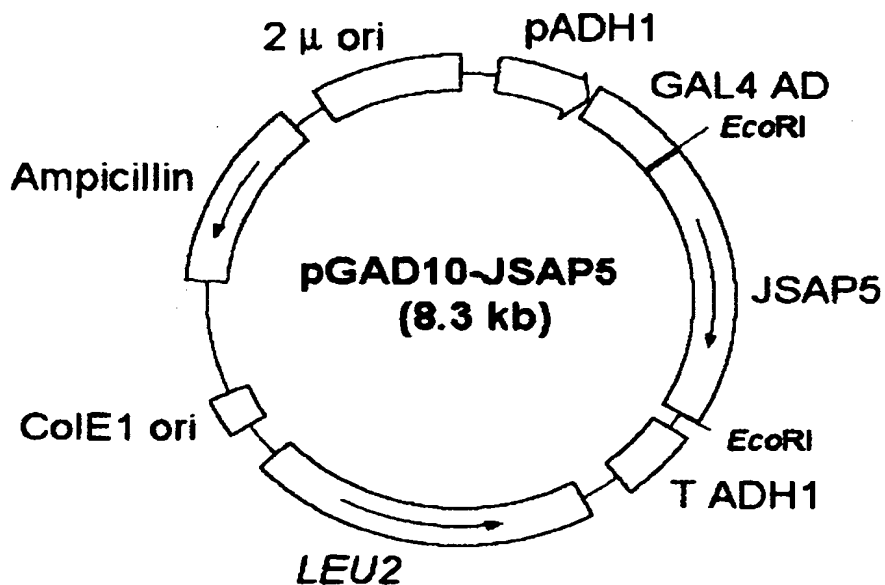
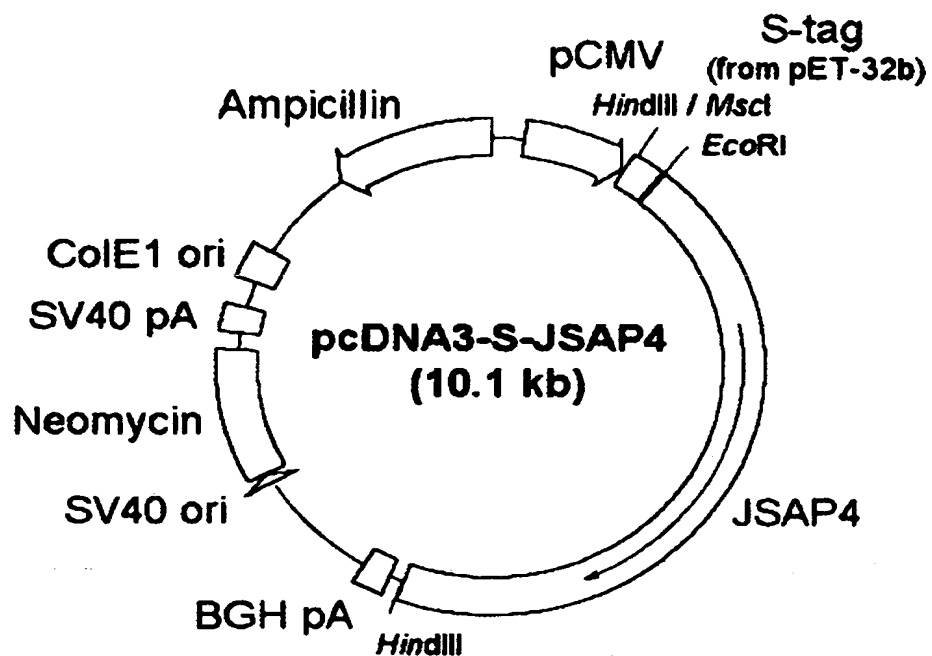
【図 1】



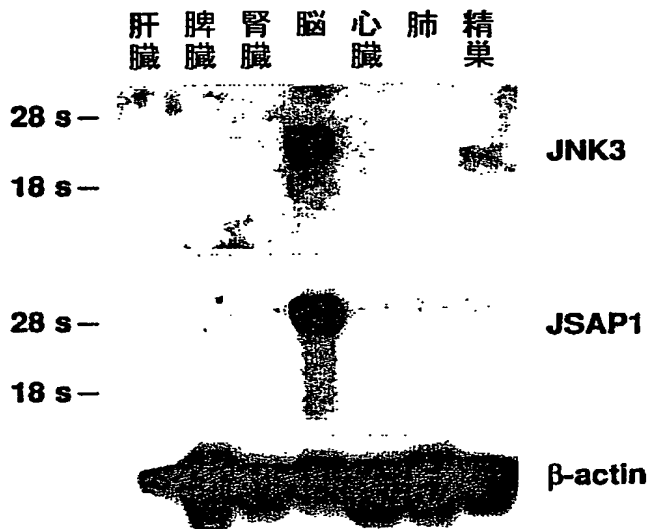
【図 2】



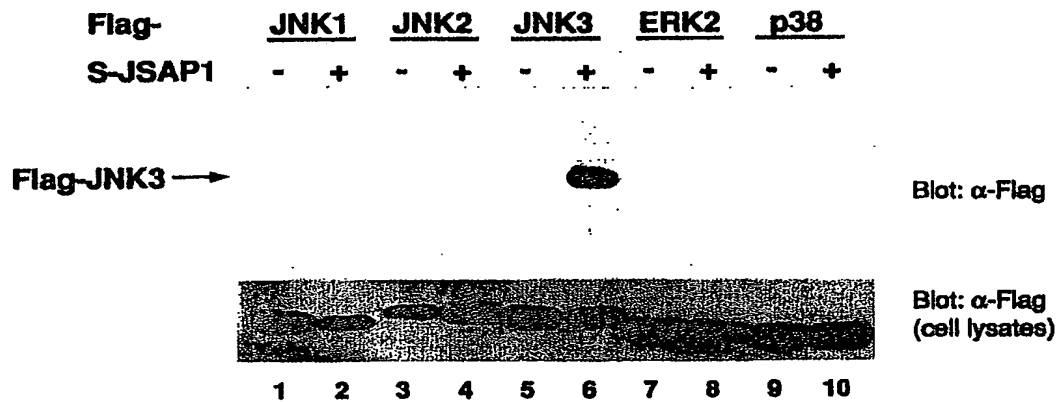
【図 3】



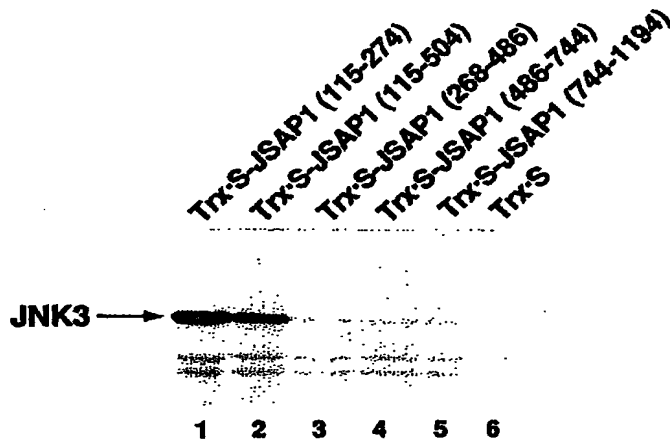
【図 4】



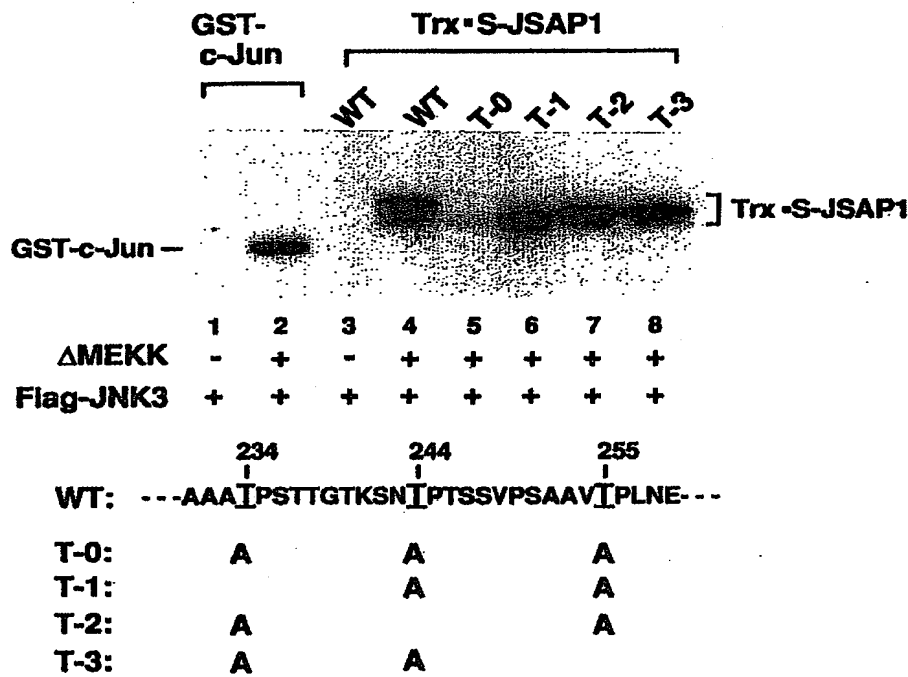
【図 5】



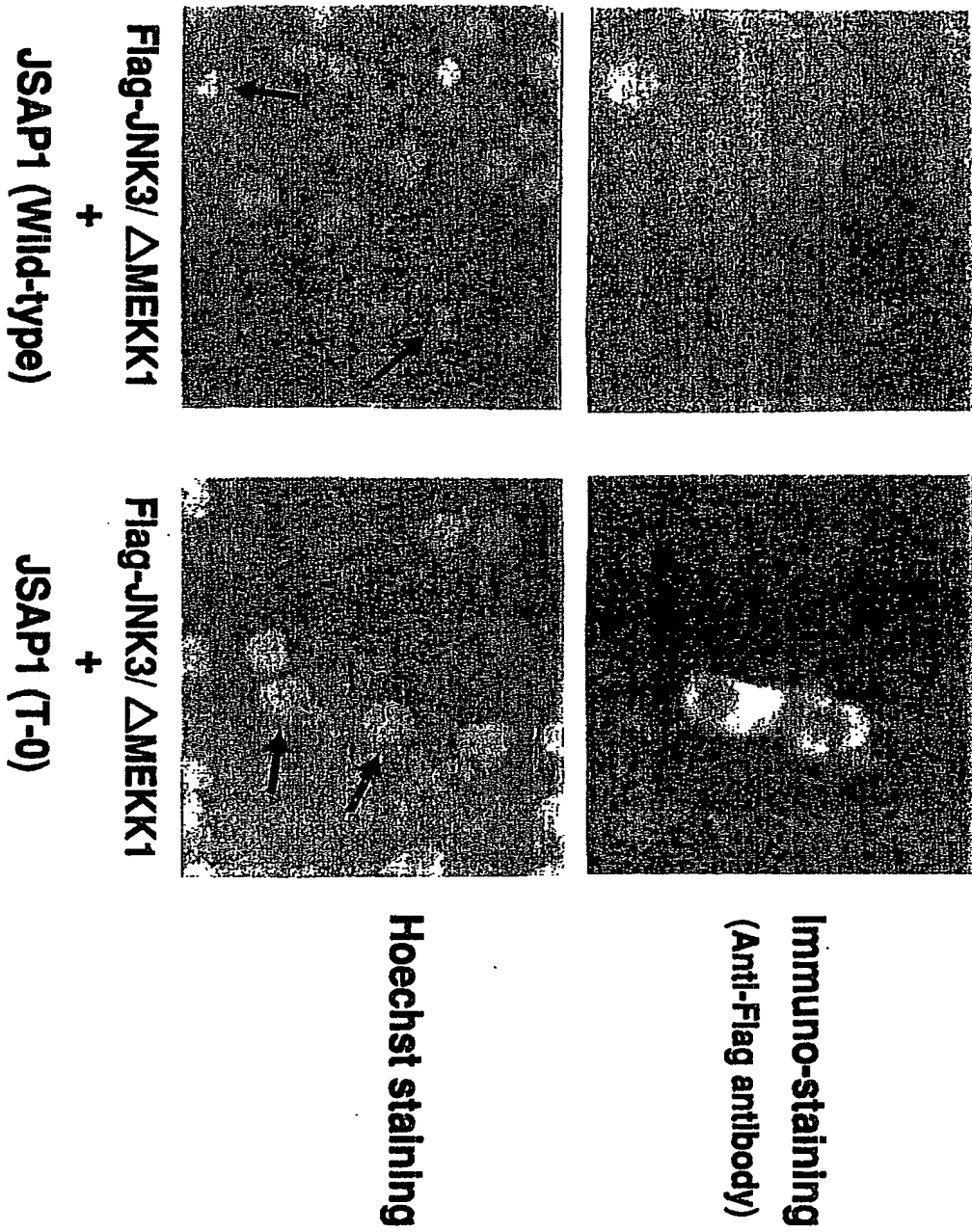
【図 6】



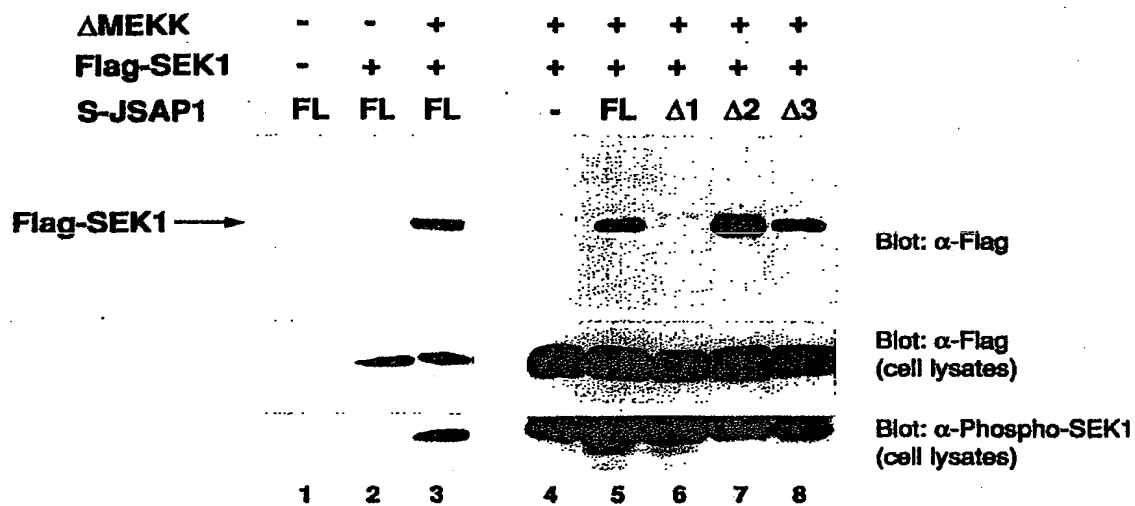
【図 7】



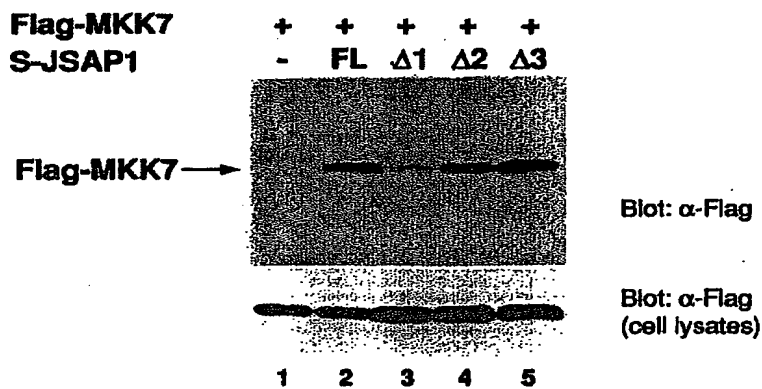
【図 8】



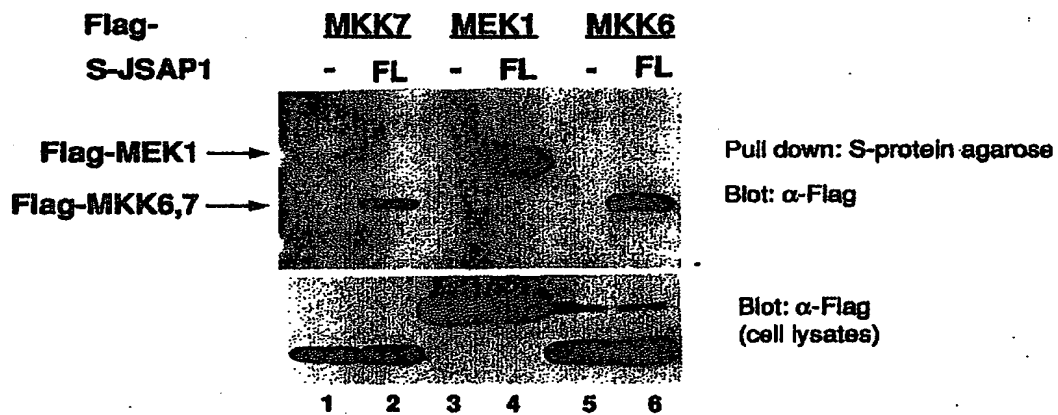
【図 9】



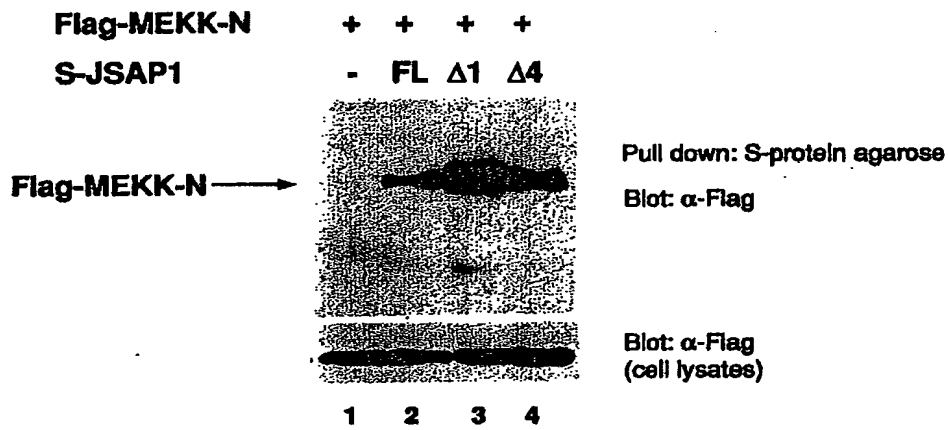
【図 10】



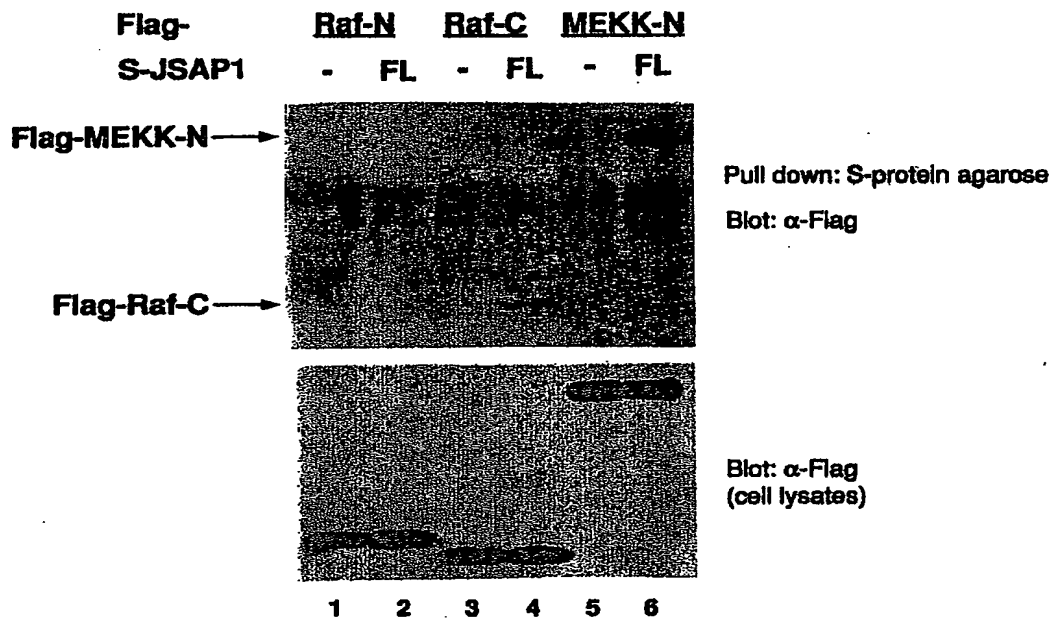
【図 1 1】



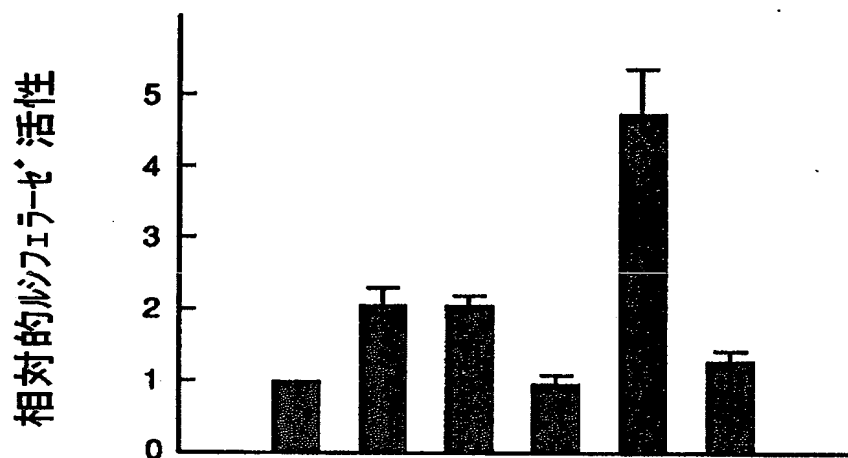
【図 1 2】



【図 1 3】

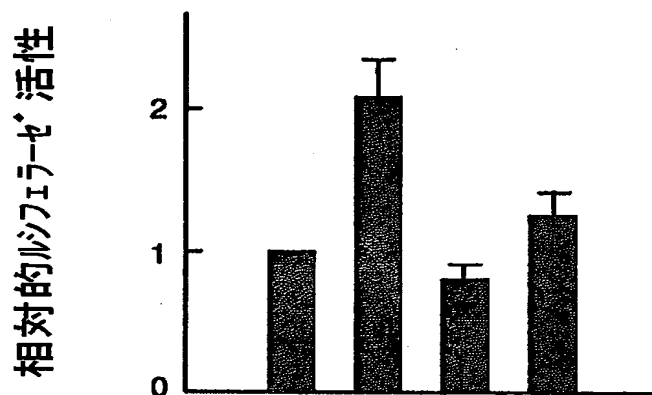


【図 1 4】



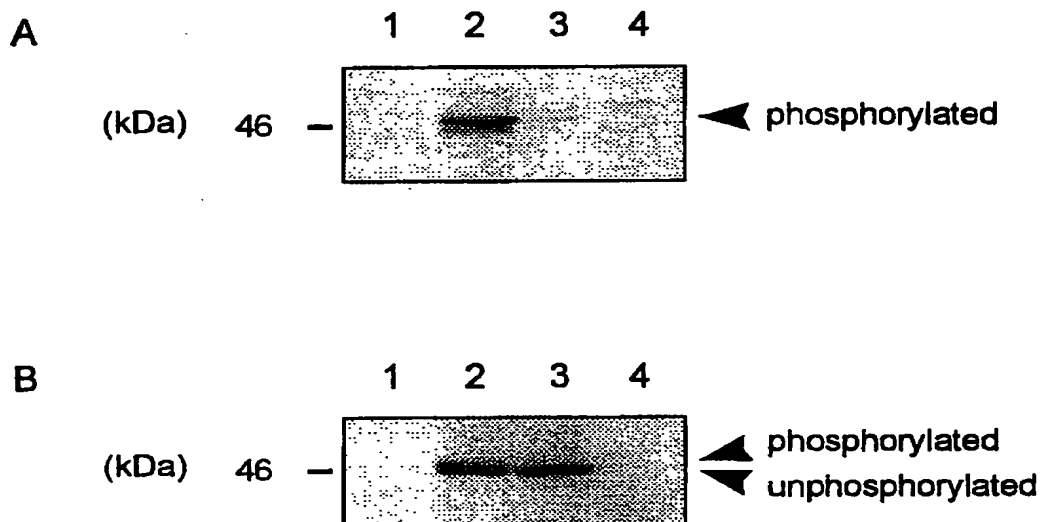
| | | | | | | |
|----------------|---|---|---|---|---|---|
| 5XGAL4-LUC | + | + | + | + | + | + |
| GAL4-c-Jun | + | + | + | + | + | + |
| S-Cdc42 (G12V) | - | + | - | - | + | + |
| S-JSAP1-FL | - | - | + | - | + | - |
| S-JSAP1-Δ5 | - | - | - | + | - | + |

【図 1 5】

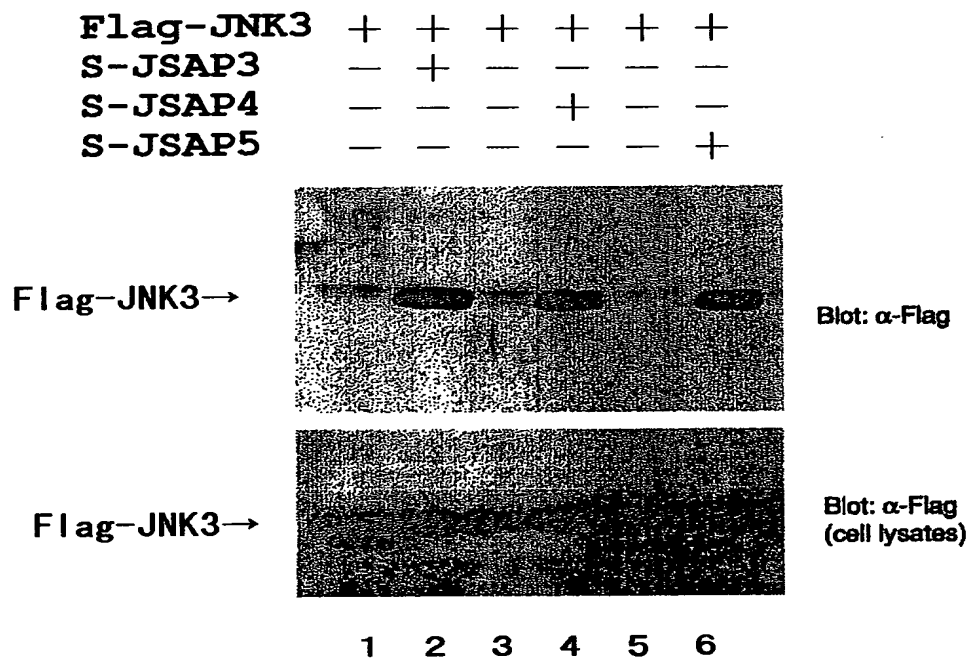


| | | | | |
|------------|---|---|---|---|
| 5XGAL4-LUC | + | + | + | + |
| GAL4-EIk1 | + | + | + | + |
| Flag-ΔRaf1 | - | + | - | + |
| S-JSAP1-FL | - | - | + | + |

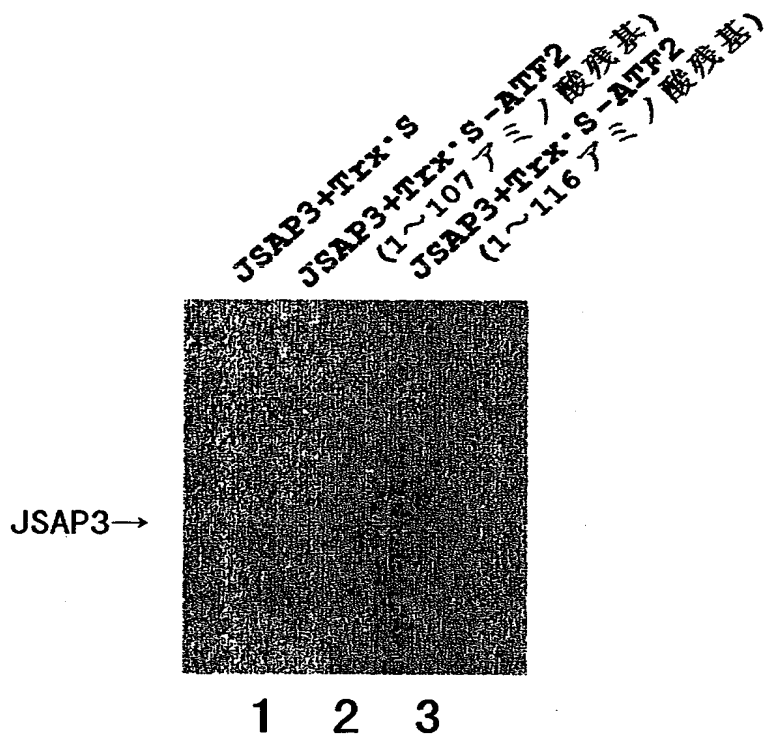
【図 1 6】



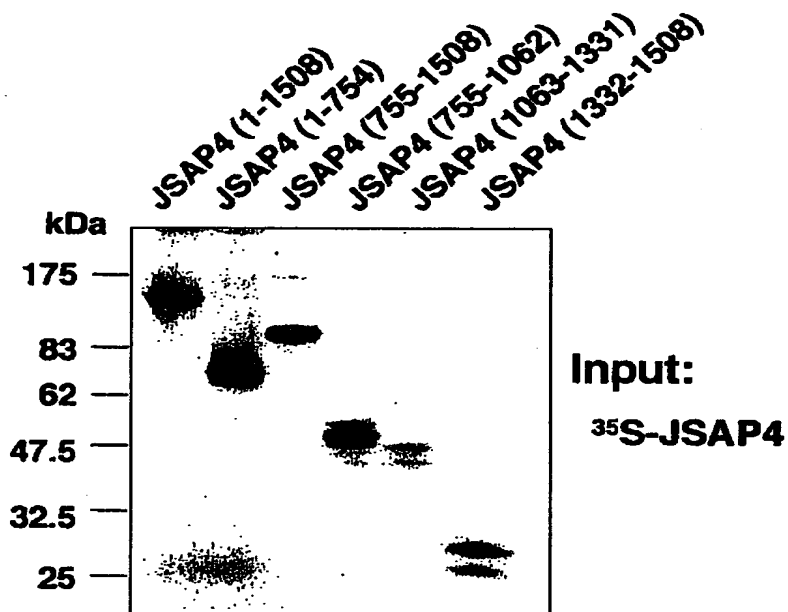
【図 1 7】



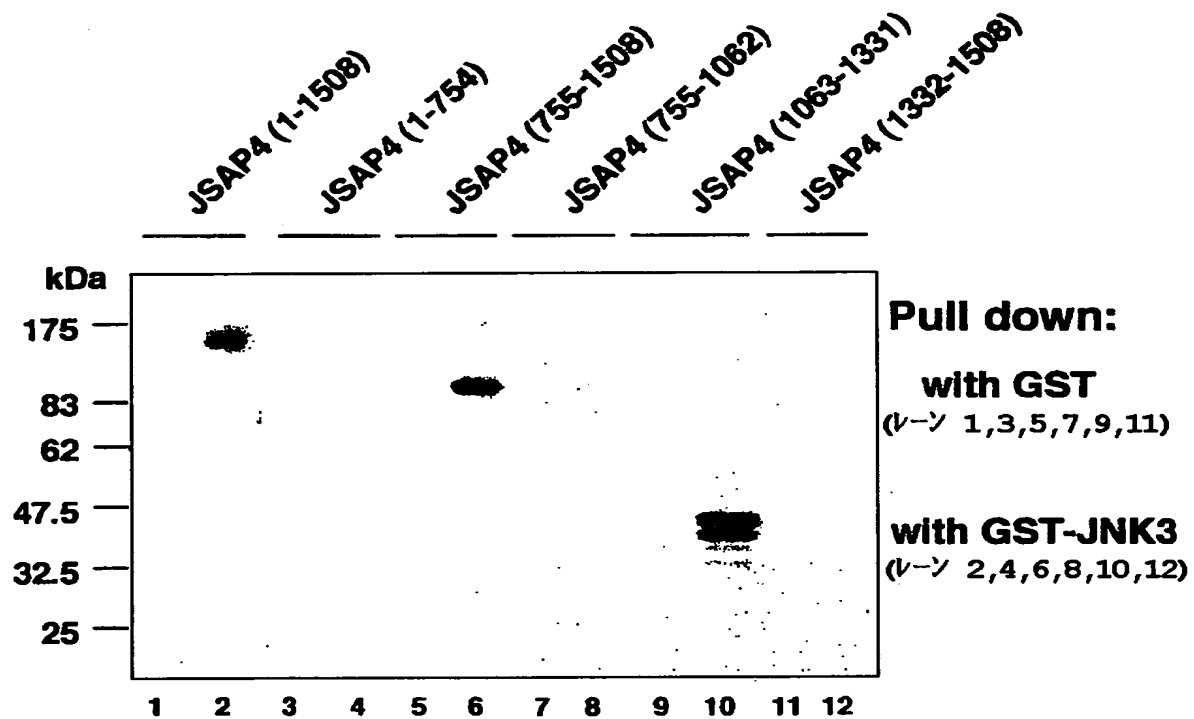
【図 1 8】



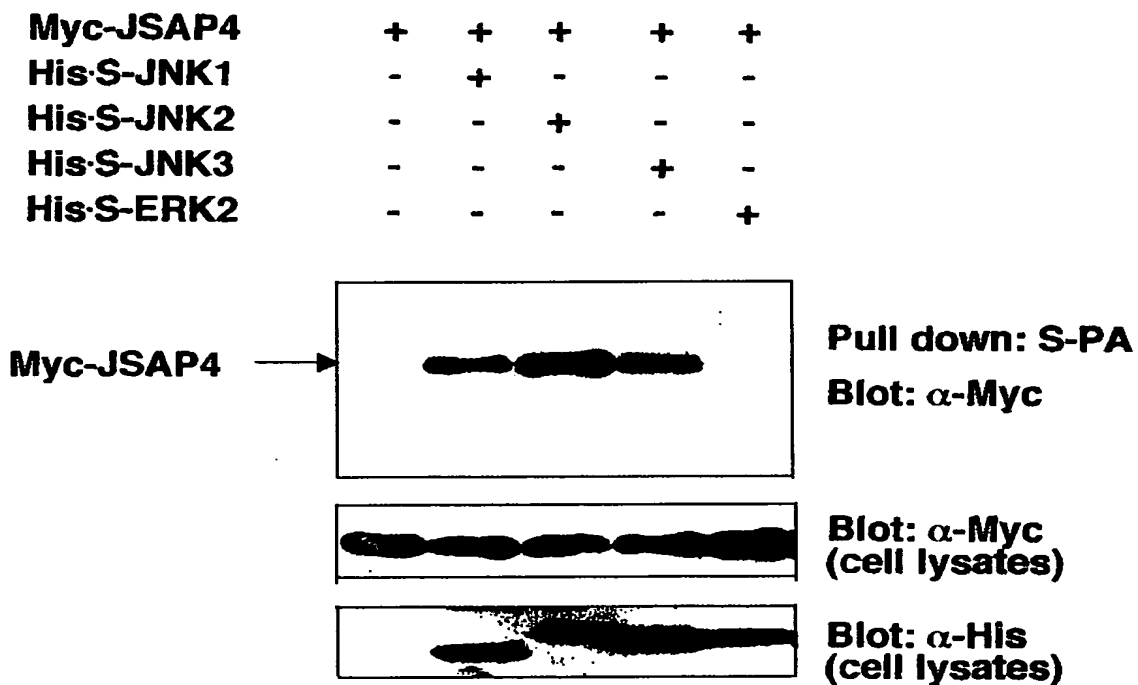
【図 1 9】



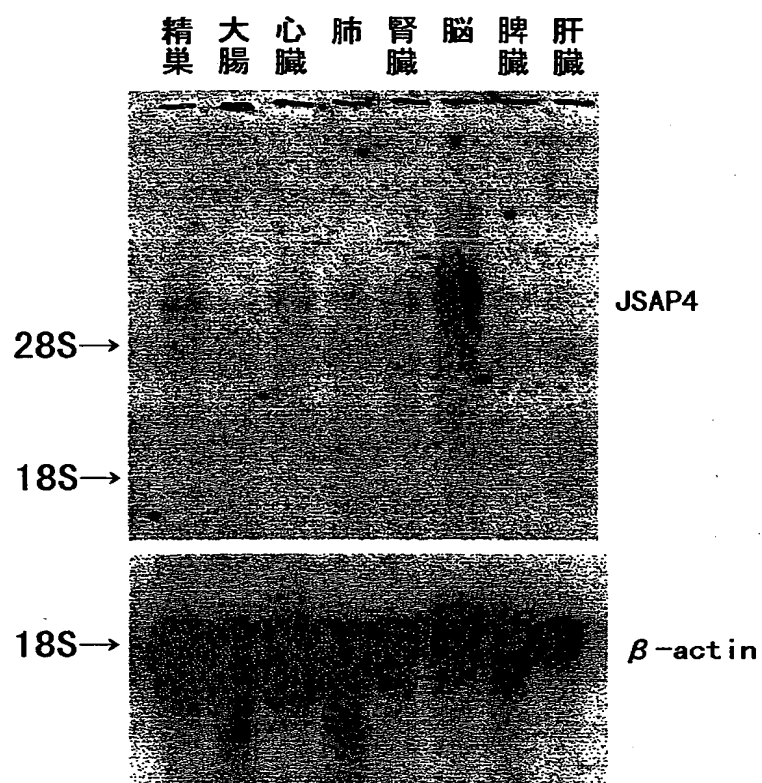
【図 2 0】



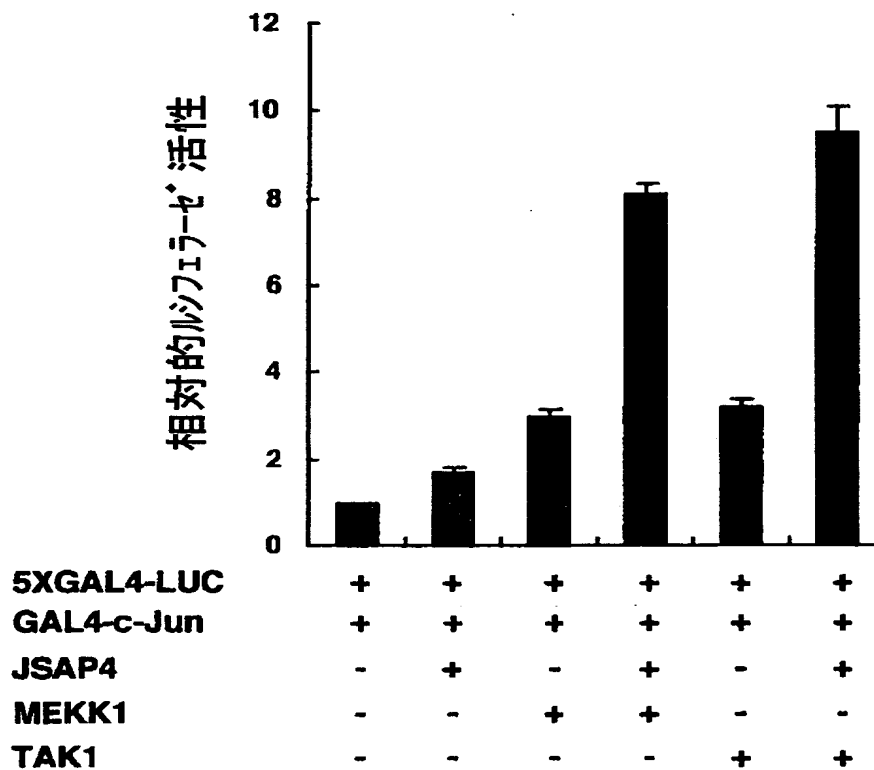
【図 2 1】



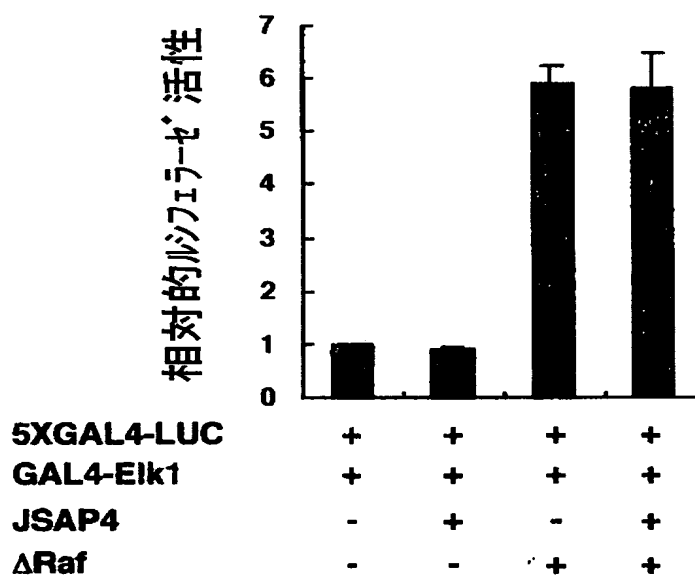
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 JNK3カスケードと関連した疾患の診断薬、予防薬、治療薬を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、JNK3に結合する新規ポリペプチドJSAP、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを組み込んで得られる組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドを用いたスクリーニング法、および該ポリペプチド、該DNAまたは該抗体を用いたJNK3カスケードと関連した疾患の診断薬、予防薬、治療薬を提供することができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日

1990年 8月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名

協和醗酵工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE RI ANK (USPTO).

THIS PAGE BLANK (USPTO).